

UNTERSUCHUNGEN ZUR ANALYTIK,
METALLSPEICHERUNG UND INDUKTION
VON METALLOTHIONEIN

Herbert Heilmaier

*Ass
München*

UNTERSUCHUNGEN ZUR ANALYTIK, METALLSPEICHERUNG UND INDUKTION
VON METALLOTHIONEIN

DISSERTATION
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Herbert Heilmaier
München
1985

Vorgelegt am 6. November 1985

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. P. Eyer

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Januar 1986

Die vorliegende Arbeit wurde vom August 1982 bis Oktober 1985 durchgeführt. Herrn Professor Dr. H. Greim danke ich für das Überlassen des Themas und die Unterstützung, die er mir während der Arbeit zuteil werden ließ. Herrn Dr. K. H. Summer danke ich für die intensive Zusammenarbeit und für das ständige Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herr Professor J. Eisenburg, Medizinische Klinik II des Klinikums Großhadern der Ludwigs-Maximilian-Universität München stellte die menschlichen Leberbiopsieproben und Herr Dr. G. Drasch, Institut für Gerichtsmedizin der Ludwigs-Maximilian-Universität München die menschlichen Nierenrindenproben zur Verfügung. Hierfür möchte ich mich herzlich bedanken.

Der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung danke ich für die Förderung durch ein Stipendium.

Für die Erkenntnis gibt es keine endgültigen Ziele, sondern der Fortschritt der Erkenntnis ist nichts als eine Differenzierung der Fragestellung.

(Hermann Hesse)

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG	1
MATERIAL UND METHODEN	4
1. Chemikalien, Lösungen und Kulturmedien	4
a. Chemikalien	4
b. Lösungen und Kulturmedien	5
2. Geräte	7
3. Tierstämme und Haltungsbedingungen	8
4. Herkunft und Aufarbeitung des menschlichen Probenmaterials	9
a. Leberbiopsien	9
b. Post mortem Nierenrindenproben	9
5. Analytische Verfahren und Probenvorbereitung	10
a. Aufarbeitung der Gewebe- und Zellextrakte	10
b. Metallanalytik und Probenveraschung	10
c. Proteinbestimmung und enzymatische Verfahren	11
d. Gelchromatographische Bestimmung von Metallothionein	11
e. Thiolatgruppenbestimmung von Metallothionein	15
f. Kadmium-Hämoglobin Bindungstest für Metallothionein	18
6. Präparation und Stabilität von Metallothionein	20
a. Präparation von Zn-Thionein	20
b. Präparation von Cd-Thionein	22
c. Präparation von Hg- und Ag-Thionein	22
d. Oxidations- und Lagerstabilität von Metallothionein	23

7. Etablierte Zelllinien	26
a. Herkunft und Kultivierung	26
b. Inkubation mit CdCl_2 und Aufarbeitung	27
c. Messung der Zytotoxizität nach Inkubation mit CdCl_2	28
8. Frisch isolierte Zellsysteme	28
a. Präparation von Hapatocyten	28
b. Präparation von Nierentubuluszellfragmenten	29
c. Bestimmung der Cd-Aufnahme und Verteilung in Hepatozyten nach Inkubation mit CdCl_2 und Cd-Thionein	30
d. Beeinflussung der Glukoneogenese in Nierentubuluszellfragmenten nach Inkubation mit CdCl_2 und Cd-Thionein	30
9. Auswertung der Versuche und statistische Verfahren	31
ERGEBNISSE	32
1. Ausarbeitung des Kadmium-Hämoglobin Bindungstestes zum raschen und empfindlichen Nachweis von Metallothionein und Untersuchung des Einflusses von Glutathion auf den Test	32
2. Metallothionein in Zellsystemen in vitro	37
a. Induktion von Metallothionein und zytosolische Cd-Verteilung in etablierten Zelllinien nach Inkubation mit CdCl_2	37
b. Cd-Aufnahme und Beeinflussung der Glukoneogenese in frisch isolierten Zellen nach Inkubation mit CdCl_2 und Cd-Thionein	41
3. Metallothionein bei Säugetieren	47
a. Organverteilung von Metallothionein in Ratten	47
b. Metallothioneininduktion durch Zn und Jodessigsäure	48
c. Metallothioneininduktion durch Penicillamin	53
d. Metallothioneininduktion durch Tetrachlorkohlenstoff	58

4. Metallothionein in menschlichem Probenmaterial	63
a. Metallothionein in Leberbiopsien	63
b. Beteiligung von Metallothionein an der Cd-Speicherung in der Nierenrinde	65
DISKUSSION	71
LITERATURVERZEICHNIS	80
ZUSAMMENFASSUNG	92
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	94
LEBENS LAUF	95

EINLEITUNG

Die Aufrechterhaltung der Funktion und Morphologie der Zelle erfordert in vielfacher Hinsicht essentielle Schwermetalle, von denen Zn und Cu wichtige endogene Vertreter sind (WESER, 1979). Diese Metalle liegen in biologischem Material nicht in freier Form, sondern größtenteils proteingebunden vor, und damit stellt ihre Bindungsform eine wichtige Einflußgröße für ihre Wirkung dar.

Erstmals 1957 wurde in der Niere des Pferdes ein Protein beschrieben, das aufgrund seines hohen Cysteinanteils (33%) in starkem Maße zur Bindung sowohl der oben genannten essentiellen als auch der toxischen Metalle Cd und Hg befähigt ist (MARGOSHES und VALLEE, 1957). Es erhielt die Bezeichnung Metallothionein. Die Aminosäurezusammensetzung dieses niedermolekularen, induzierbaren Proteins ist durch Fehlen von aromatischen Aminosäuren gekennzeichnet. Es besteht weitreichende Homologie zwischen den Metallothioneinen verschiedener Tierspezies. In Säugetieren sind mehrere Isoformen dieses Proteins mit identischer Anzahl und Position der Cysteingruppen beschrieben (KÄGI und NORDBERG, 1979). Da die Isoformen auch gleiche Metallmengen binden können, wird in der hier vorliegenden Arbeit zwischen den Isoformen nicht unterschieden.

Die Affinität des Proteins zu Metallen ermöglicht im physiologischen Geschehen eine Beteiligung von Metallothionein am Transport, an der Zellaufnahme, an der Übertragung und an der Speicherung essentieller und toxischer Schwermetalle. Die stabile Bindung von Cd an den Thioneinrest bewirkt, daß unter neutralen Bedingungen keine Freisetzung des Cd aus dieser Bindungsform beobachtet wird, solange kein Abbau des Proteinanteils stattfindet. Demgegenüber tauscht Thionein-gebundenes Zn rasch gegen Cd aus (WHANGER und RIDLINGTON, 1982). Zur Beurteilung der Rolle von Metallothionein an der Cd-Wirkung auf zelluläre Vorgänge fehlt es an Information über mögliche Unterschiede in der Aufnahmekapazität von Zellen für Cd aus Thionein-gebundener und anorganischer Form und an Information über Unterschiede in der Beeinflussung von intrazellulären Stoffwechselvorgängen in Abhängigkeit von der Bindungsform des Schwermetalls. Ferner ist die Beteiligung von Thionein an der Cd-Speicherung in der menschlichen Nierenrinde ungeklärt.

Die Induktion von Metallothionein durch Metalle ist gut untersucht (KÄGI und NORDBERG, 1979; EATON et al., 1980), wenig Befunde liegen bisher über seine Induktion durch Chemikalien vor (KOTSONIS und KLAASSEN, 1979; OH et al., 1978). Es ist unklar, in welchen Organen das Protein durch Chemikalien induziert werden kann, und ob eine Metallothioneininduktion für den Menschen relevant sein kann.

Metallothionein läßt sich aufgrund seiner geringen Molekülgröße gel-chromatographisch von anderen Proteinen abtrennen und über den Metallgehalt bzw. die Metallbindungsfähigkeit nachweisen. Diese heute gebräuchlichste Methode zur Bestimmung über Gelchromatographie ist jedoch zeitaufwendig und erfaßt das Protein in Geweben erst oberhalb eines Gehalts von 20-40 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht. Damit reicht die Meßempfindlichkeit nicht aus, die basalen Metallothioneingehalte beispielsweise in der Leber und den meisten anderen Organen der Ratte zu bestimmen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Möglichkeiten zur Verbesserung der Analytik von Metallothionein zu erarbeiten sowie einen Überblick zu erhalten über die Rolle des Proteins bei der Speicherung und beim Transport essentieller und toxischer Metalle und seine Induktion durch Chemikalien und Metalle in verschiedenen in vitro und in vivo Systemen.

MATERIAL UND METHODEN

1. Chemikalien, Lösungen und Kulturmedien

1a. Chemikalien:

Olivöl DAB 7 (Bender und Hobein, München).

Penicillin, Streptomycin, Trypsin (Biochrom, Berlin).

Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber, Aprotinin aus Rinderlunge, Kollagenase aus *Clostridium histolyticum*, Cytochrom C aus Pferdeherz, Glutathion, Lactat, Pyruvat Mononatriumsalz, Rinderserumalbumin (Boehringer, Mannheim).

Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, 2-Mercaptoethanol (Fluka, Eschborn/Taunus).

Carbogen (5 % CO₂, 95 % Luft), flüssiger Stickstoff (Linde, München).

Chloroform, Ethanol, Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz, Kadmiumchlorid, Mayer's Hämaunlösung, Perchlorsäure, Quecksilber-II-chlorid, Salpetersäure, Salzsäure, Silbernitrat, Tetrachlorkohlenstoff, Triton-X-100, Zinksulfat, Salze für Lösungen und Medien (Merck, Darmstadt).

Sephadex G-75 superfine (Pharmacia, Freiburg).

5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (ELLMAN's Reagens), Ethylendi-amintetraessigsäure-Dinatrium-Kalziumsalz (EDTA), Jodessigsäure, D-Penicillamin Hydrochlorid, Rinderhämoglobin Typ II (Sigma Chemie, Taufkirchen).

1b. Lösungen und Kulturmedien:

Physiologische Kochsalzlösung ('Saline'): 0,9 g NaCl ad 1 Liter destilliertes Wasser.

'Phosphate Buffered Saline' (PBS), pH 7,4:

Salz	Endkonzentration (mM)	Einwaage (g)
NaCl	122	7,1
KCl	2,68	0,20
NaH ₂ PO ₄ · 12 H ₂ O	8,35	2,98
KH ₂ PO ₄	1,47	0,20

ad 1000 ml H₂O

Medien für die permanenten Zellkulturen:

Dulbecco's Minimum Essential Medium und Ham's F-12 Medium (Biochrom, Berlin), NCTC 135 Medium (Flow Laboratories, Meckenheim).

Krebs-Henseleit-Puffer, pH 7,4:

Salz	Endkonzentration (mM)	Stammlösung	
		Konzentration (g/l)	verwendetes Volumen (ml)
NaCl	154,0	90	100
KCl	6,1	115	4
KH ₂ PO ₄	1,55	105	2
MgSO ₄	1,55	191	2
NaHCO ₃	25,0	65	32
CaCl ₂	3,4	167	3

ad 1000 ml H₂O

Medium für die Hepatozytenpräparation, pH 7,4:

Salz	End- konzentration (mM)	Stammlösung	
		Konzentration (g/l)	verwendetes Volumen (ml)
NaCl	115,0	67,2	100
KCl	5,9	4,4	100
MgCl ₂	1,2	12,2	20
CaCl ₂	2,5	18,4	20
NaHCO ₃	25,0	21,0	100
NaH ₂ PO ₄	1,2	8,3	20
Na ₂ SO ₄	1,2	8,5	20
Glukose	50,0	99,1	20
L-Glutamin	2,0	29,2	10
HEPES	25,0	59,6	100
Lactat	2,1	20,2	10
Pyruvat	0,3	3,3	10

ad 1000 ml H₂O

Außerdem wurden BME Aminosäuren zugesetzt (Endkonzentrationen siehe PAUL, 1979).

Ca-freies Medium für die Hepatozytenpräparation: wie oben, jedoch ohne CaCl₂.

Alle Lösungen wurden unter Verwendung von salzfreiem Wasser hergestellt, das über ein Milli-Q UF System der Firma Millipore, Eschborn, gewonnen wurde. Es ist vergleichbar mit bidestilliertem Wasser, weist jedoch geringere Rückstände an Spurenelementen auf als das in einer Quarzapparatur destillierte Wasser.

2. Geräte

Ultrafiltrationskammern, Modell 12 und 52; Centricon-10 (Amicon, Witten/Ruhr).

Microfuge B, Ultrazentrifuge Modell Spinco 12 65b, Rotoren 50 Ti und 42,1 (Beckman, München).

Branson Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Company, Danbury, USA).

Potter-Elvehjem Homogenisator mit Teflonstempel, 2, 5, 15 und 30 ml (Braun Melsungen).

Gewebekulturschalen, 35, 60, 100 mm Durchmesser (Falcon, Heidelberg).

CO₂-Inkubator (Heraeus, Hanau).

Ultra-Turrax TP 18-10 (Janke u Kunkel IKA Werk, Staufen im Breisgau).

Peristaltikpumpe Varioperpex 2120, UV-Detektor Uvicord 2138, Potentiometerschreiber 2210, Fraktionssammler Ultro Rac II 2070 und sonstiges Chromatographiezubehör (LKB, Gräfenberg).

Wasserbad mit Schüttleinrichtung (Köttermann, Hänggen).

'Gyrotory' Wasserbadschüttler, Modell G 76 (New Brunswick Science Co., USA).

Umgekehrtes Phasenkontrastmikroskop LWD 0,52 mit Kamera (Nikon, Japan).

pH-Meter, Modell 701 (Orion Research, USA).

Atom-Absorptions-Spektrometer, Modell 5000, mit Graphitrohratomisierung (HGA 500) und Zeemann Hintergrundkompensation; UV/VIS Spektralphotometer Lambda 5 (Perkin-Elmer, Überlingen).

Zentrifuge RC-2B, Rotoren SS-34 und SE-12 (Sorvall - Du Pont, Frankfurt/Main).

Druckveraschungsgeräte mit Quarzampullen (Wälischmiller, Markdorf).

3. Tierstämme und Haltungsbedingungen

Für die Untersuchungen wurden männliche Wistar-Ratten (180-200 g) und weibliche NMRI Mäuse (etwa 30 g) aus Inzuchtstämmen verwendet, die unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen aufgezogen wurden. Die Tiere wurden in einem 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus und bei einer konstanten Temperatur von 23-24°C bei 50% Luftfeuchtigkeit gehalten. Sie erhielten Leitungswasser und ein Standard-Labor-Futter (Altromin, Lage) nach freier Wahl (Tab. 1).

Tab. 1 Inhaltsstoffe des Standardlaborfutters Altromin*

Rohnährstoffe	%	Spurenelemente	mg/kg
Rohprotein	19,0	Fe	135,0
Rohfett	4,0	Mn	75,0
Rohfaser	6,0	Cu	18,0
Rohasche	7,0	Zn	75,0
Feuchtigkeit	13,5	Cd	0,1
		Hg	0,01
		Pb	0,2

* Werksangaben

4. Herkunft und Aufarbeitung des menschlichen Probenmaterials

4a. Leberbiopsien

Die Leberproben wurden im Klinikum Großhadern Patienten durch Nadelbiopsie entnommen (Menghini-Technik). Herr Professor J. Eisenburg, Medizinische Klinik II des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians Universität München, stellte die für die Diagnose nicht erforderlichen Reste mit den Informationen über das Krankheitsbild der Patienten zur Verfügung.

Die Proben wurden in physiologischer Kochsalzlösung bei -18°C bzw. -80°C aufbewahrt. Zur Analyse wurden die Proben aufgetaut, von anhaftender Feuchtigkeit befreit, gewogen und in 30 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, sonifiziert (Proteinkonzentration zwischen 1 und 2 mg/ml). Anschließend wurde das Leberhomogenat 5 min bei 8000 g zentrifugiert und der Metallothioneingehalt im Überstand mit dem Kadmium-Hämoglobin Bindungstest bestimmt (siehe MATERIAL UND METHODEN 5f).

4b. Post mortem Nierenrindenproben

Aus dem Sektionsgut des Gerichtsmedizinischen Instituts, Ludwig-Maximilians Universität München, der Jahre 1981-1983 wurden Proben der Nierenrinde entnommen und bei -18°C in Polypropylenbehältern aufbewahrt. Die Proben wurden von Dr. G. Drasch zur Verfügung gestellt, zusammen mit den Informationen über das Rauchverhalten der Individuen, die er auf schriftliche Anfragen von den Anverwandten der Verstorbenen erhalten hatte.

Zur Analyse wurden die Proben aufgetaut, gewogen und in 4 Volumenteilen 30 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, homogenisiert. In einem Teil des Homogenates wurden nach Naßveraschung die Gesamtgehalte an Cd, Zn und Cu in den Nierenrinden bei einer Endverdünnung von 1:50 bestimmt (siehe MATERIAL UND METHODEN 5b). Die Thionein-gebundenen Metallgehalte wurden nach gelchromatographischer Auftrennung der zytosolischen Proteine bestimmt (siehe MATERIAL UND METHODEN 5d).

5. Analytische Verfahren und Probenvorbereitung

5a. Aufarbeitung der Gewebe- und Zellextrakte

Die Gewebe wurden, wenn nicht anders angegeben, in 30 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 unter Eiskühlung mit Hilfe einer der folgenden Geräte homogenisiert:

Mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator: Gehirn, Leber, Lunge, Milz, Niere, Pankreas und Thymus.

Mit dem Ultra-Turrax: Dünndarm, Herz, Magen und Muskel.

Mit dem Sonifier: Zellkulturen und Leberbiopsien.

Das resultierende Homogenat wurde entweder 5 min bei 8000 g (Beckman Microfuge B; 11 000 UPM), 30 min bei 18 000 g (Rotor SE 12; 15 000 UPM) oder 60 min bei 100 000 g (Rotoren 50 Ti und 42,1; 35 000 UPM) zentrifugiert. Nach Entfernen der Fettschicht wurde der jeweilige Überstand (S 8, S 18 oder S 100) zur Messung verwendet oder sofort in Eppendorf Reaktionsgefäße portioniert und bei -80°C oder -20°C gelagert. Der S 100-Überstand wird in der vorliegenden Arbeit auch als zytosolische Fraktion oder Zytosol bezeichnet.

5b. Metallanalytik und Probenveraschung

Für die Metallanalytik wurde entweder ein Graphitrohrföfen-Atom-Absorptions-Spektrometer (AAS), Modell 5000 der Firma Perkin Elmer, Überlingen, ausgerüstet mit Zeeman Hintergrundkompensation oder ein Atom-Emissions-Spektrometer mit induktiv gekoppelter Plasmaanregung (ICP-AES), Modell JY 38P der Firma Instruments SA, wie bei SCHRAMM et al. (1982) beschrieben, verwendet. Je nach vorhandenem Probenvolumen und gewünschter Meßempfindlichkeit (Tab. 2) wurde eine der beiden Methoden gewählt, wobei deren Richtigkeit durch Messung von Referenzproben mit Zertifikat (Behringwerke, Marburg) sichergestellt wurde.

Tab. 2 Minimal benötigtes Probenvolumen und linearer Messbereich der Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) und der Atom-Emissions-Spektroskopie (ICP-AES) für Cd, Zn und Cu

Element	AAS		ICP-AES	
	minimales Probenvolumen (ml)	linearer Messbereich (ng/ml)	minimales Probenvolumen (ml)	linearer Messbereich (ng/ml)
Cd	0,05	1 - 10	2 ^a	10 - 800
Cu	0,05	1 - 50	2 ^a	10 - 800
Zn	n.b. ^b	n.b. ^b	2 ^a	10 - 800

^a Für 3 aufeinanderfolgende Messungen; bei Reduktion auf 2 Messungen wird etwa 1 ml benötigt. Bei Simultanmessung mehrerer Elemente werden 5 ml benötigt.

^b Nicht bestimmt, da auftretende Zn-Freisetzung aus den Graphitrohrküvetten die Messung überlagert.

Die Metallgehalte konnten in Eluaten von säulenchromatographischen Trennungen und in Medien direkt gemessen werden, wogegen den Messungen in Gewebehomogenaten und im Zytosol zur Vermeidung von störenden Matrixeinflüssen eine Naßveraschung mit HNO₃ unter Druck vorausging. Hierzu wurde die Methode von SCHRAMMEL *et al.* (1980) verwendet mit dem Unterschied, daß die Ofentemperatur teilweise von 140°C auf 160°C und die Verweildauer von 6 auf 8 h erhöht wurde. Nach der Veraschung wurden die Proben mit salzfreiem Wasser auf ein definiertes Volumen aufgefüllt, um den jeweils linearen Meßbereich der verwendeten Methode (Tab. 2) zu erreichen.

Die Metallgehalte in Geweben wurden auf das Frischgewicht bezogen.

5c. Proteinbestimmung und enzymatische Verfahren

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von LOWRY et al. (1951) mit Rinderserumalbumin als Standard.

Die Bestimmung der Summe von reduziertem und oxidiertem Glutathion erfolgte nach TIETZE (1969).

Glutathiondisulfid wurde nach SIES und SUMMER (1975) bestimmt.

Glukose wurde nach BERGMEYER et al. (1970) bestimmt.

5d. Gelchromatographische Bestimmung von Metallothionein

Für die gelchromatographische Bestimmung von Metallothionein über Sephadex G-75 Säulen wurden S 100-Überstände der Gewebehomogenate verwendet.

Die Bedingungen wurden jeweils so gewählt, daß die höchste Metallothioneinkonzentration zwischen den Fraktionen 24 und 28 eluierte (Tab. 3).

Tab. 3 Säulendimensionen und Elutionsbedingungen der verwendeten Sephadex G-75 Säulen

Säulendimensionen (cm)	Pumpgeschwindigkeit (ml/h)	Fraktionsvolumen (ml)
0,9 x 11,0	7	0,3
0,9 x 13,5	7	0,4
0,9 x 17,0	7	0,7
1,6 x 84,0	16	4,5
1,6 x 84,0	18	5,0

Jede Säule wurde mit Dextranblau (M_r : 2 000 000) und mit Metallothionein (M_r : 10 000*) kalibriert. Bei Bedarf wurde zusätzlich mit Alkohol-Dehydrogenase aus Pferdeleber (M_r : 83 000), Cytochrom C aus Pferdeherz (M_r : 12 500), Aprotinin aus Rinderlunge (M_r : 8 000), reduziertem Glutathion (M_r : 307) und Zn (Atomgewicht: 65) geeicht. Metallothionein eluierte bei einem relativen Elutionsvolumen, V_e/V_0 , von 1,8 bis 2,3, was mit Literaturwerten übereinstimmt (WAALKES et al., 1984; BELL, 1979). Die Fraktionen mit einem relativen Elutionsvolumen 1,0 bis 1,8 enthielten hochmolekulare Proteine mit Molekulargewichten größer als 10 000.

Alle chromatographischen Arbeiten wurden bei +4°C durchgeführt. Im Eluat wurde routinemäßig die optische Dichte bei 254 nm aufgezeichnet (schwache Absorptionsbande von Cd-Thionein) und in den Fraktionen die jeweils interessierenden Metalle bestimmt.

Da die Stöchiometrie der gebundenen Metalle im Metallothionein bekannt ist (7 mol Zn oder Cd bzw. 10 mol Cu/mol Thionein; WINGE und MIKLOSSY, 1982a,b) und die meisten Gewebe keine weiteren mengenmäßig bedeutenden metallbindenden Proteine mit einem Molekulargewicht um 10 000 besitzen, können die Metallothioneingehalte durch Metallbestimmung im Bereich des Sephadex G-75 Chromatogramms mit einem relativen Elutionsvolumen zwischen 1,8 und 2,3 ermittelt werden.

Der Vergleich der Elutionsprofile von Leberzytosol aus unbehandelten und Zn-vorbehandelten Mäusen zeigt die Grenzen dieser Bestimmungs-methode. Sie ist nicht empfindlich genug, beispielsweise die basalen Metallothioneingehalte in der Mäuseleber zu erfassen (Abb. 1). Da teilweise höhermolekulare Proteine in den Bereich von Metallothionein ge-

* Das Molekulargewicht von Metallothionein variiert zwischen 6 600 und 6 900 je nach der Art der gebundenen Metalle (KÄGI und Nordberg, 1979). Infolge der ellipsoiden Gestalt (Achsverhältnis 6:1) eluiert das Protein bei der Sephadex G-75 Trennung wie ein Protein mit einem scheinbaren Molekulargewicht von 10 000 (KÄGI et al., 1979).

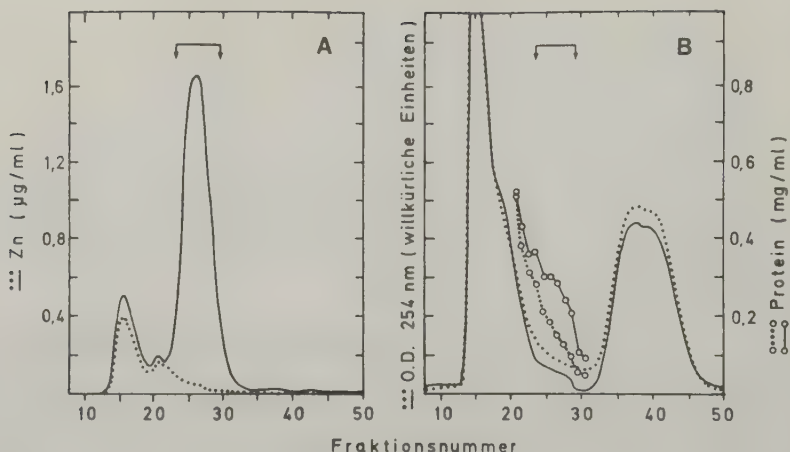


Abb. 1 Sephadex G-75 Elutionsprofile von Leberzytosol aus unbehandelten und Zn-vorbehandelten Mäusen

Aus den Lebern von unbehandelten (.....) und Zn-vorbehandelten (—) (i.p., 3×10 mg Zn/kg einer Zinksulfat-Lösung) NMRI-Mäusen wurde das Zytosol eines 20%igen Homogenates (w/v) in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 bereitet. Jeweils ein Aliquot von 2 ml, entsprechend 0,4 g Leberfrischgewicht, wurde auf eine 1,6 x 84 cm Sephadex G-75 Säule aufgetragen, und 5 ml Fraktionen wurden bei einer Flußgeschwindigkeit von 18 ml/h gesammelt. In den Fraktionen wurden die Zn-Gehalte (A) und die optische Dichte (O.D.) bei 254 nm sowie die Proteingehalte in den Fraktionen 21-30 (B) bestimmt. Die Position von Metallothionein ist durch Pfeile gekennzeichnet.

schleppt werden, liegt die Nachweisgrenze der gelchromatographischen Bestimmungsmethode bei etwa 20-40 µg Metallothionein pro g Gewebefrischgewicht.

5e. Thiolatgruppenbestimmung von Metallothionein

ELLMAN (1959) beschrieb erstmalig den Einsatz von 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) zur Quantifizierung von Sulfhydrylgruppen in biologischem Material. Die Methode wurde von SEDLAK und LINDSAY (1968) auf ihre Anwendbarkeit hin untersucht und von BÜHLER und KÄGI (1974) zur Bestimmung von Metallothionein vorgeschlagen. Da der Cysteingehalt von Metallothionein bekannt ist (33%) und pro Mol Thiolatgruppen ein Mol 5'-Thio-2-nitrobenzoesäure mit einem Extinktionskoeffizienten bei 405 nm von $13,94 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ (SUMMER et al., 1979) aus ELLMAN's Reagens gebildet wird, können hierüber die Metallothioneingehalte berechnet werden. Diese Bestimmung beruht auf einem metallunabhängigen Kriterium, dem Cysteingehalt, ist also eine direkte Nachweismethode für Thionein. Aufgrund der möglichen Heterogenität im Metallanteil von Metallothionein galt es zu prüfen, unter welchen Voraussetzungen sich diese Methode zur Bestimmung von Metallothionein eignet, und ob sie generell für Formen mit unterschiedlicher Metallbeladung anwendbar ist.

Hierzu wurden jeweils 2,5 nmol Zn-Thionein, Cd-Thionein, Hg-Thionein und Ag-Thionein (zur Präparation siehe MATERIAL UND METHODEN 6a,b,c) mit ELLMAN's Reagens versetzt und die Farbentwicklung bei 405 nm verfolgt. Dabei erreichte Zn-Thionein nach 120 min und Cd-Thionein nach 16 h einen stabilen* Maximalwert. Er entsprach dem erwarteten Wert von 0,67 Extinktionseinheiten, wie er über die Metallmessung und der Annahme von 20 mol Thiolatgruppen/mol Metallothionein berechnet wurde. Hg-Thionein erreichte innerhalb des Beobachtungszeitraums von 16 h diesen Erwartungswert nicht, und bei Ag-Thionein konnte keine Reaktion mit ELLMAN's Reagens verzeichnet werden (Abb. 2). Als Grund für die Reaktivitätsunterschiede sind die verschiedenen Stabilitäten der Me-

* Der in Abb. 2 beobachtete leichte Anstieg beim Zn-Thionein nach 120 min ist auf die Konzentrierung der Lösung infolge Verdunstung zurückzuführen. Bei verschlossener Küvette blieb der Wert stabil.

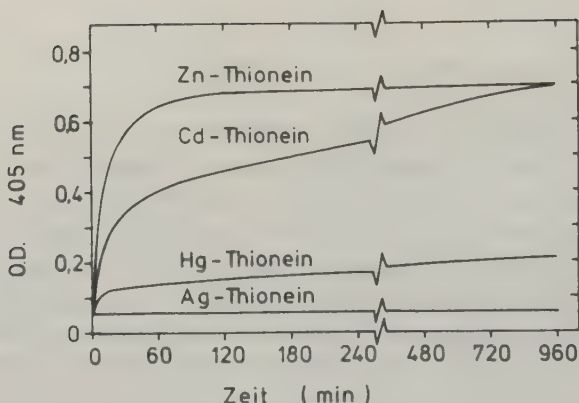


Abb. 2 Zeitabhängigkeit der Reaktion von Zn-, Cd-, Hg- und Ag-Thionein mit ELLMAN's Reagens

Zn-, Hg- und Ag-Thionein wurden wie unter MATERIAL UND METHODEN 6a und 6c beschrieben bereitet. Cd-Thionein wurde analog Hg- und Ag-Thionein durch Metallaustausch aus Zn-Thionein erhalten. Jeweils 2,5 nmol Metallothionein, entsprechend 50 nmol Thiolatgruppen, wurden in 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 mit 0,01 ml einer 0,1%igen Lösung (w/v) von ELLMAN's Reagens versetzt. Im Photometer wurde die zeitliche Veränderung der optischen Dichte (O.D.) bei 405 nm über 16 h verfolgt.

tall-Thionein-Komplexe anzusehen. Die gefundene Reihenfolge der Reaktivitäten entspricht der Reihenfolge der Metallbindungsaffinitäten (BRADY, 1982).

Die direkte Thiolatgruppenmessung mit ELLMAN's Reagens ist somit für Zn-Thionein und Cd-Thionein prinzipiell möglich, wobei die relativ langen Reaktionszeiten berücksichtigt werden müssen. Für die Bestimmung von Hg- und Ag-Thionein ist die Methode ohne Modifikation nicht geeignet. Denkbar wäre hierbei der Zusatz von Komplexbildnern oder das Ansäuern der Proben, um die Metall-Thiolat-Bindungen zu lösen.

Die Methode der direkten Thiolatgruppenbestimmung bewährte sich auch bei der Messung von Metallothionein nach Sephadex G-75 Chromatogra-

phie. Hierzu wurde jeweils ein Aliquot der Fraktionen (0,7-1,0 ml) mit 10 μ l einer 0,1%igen (w/v) Lösung von 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) versetzt und nach 120 min die optische Dichte bei 405 nm gemessen. In dem Chromatogramm des Leberzytosols von Zn-vorbehandelten Mäusen standen im Bereich von Metallothionein der Proteinschwefel und die gebundenen Zn-Ionen in einem stöchiometrischen Verhältnis von 3,2:1 (Abb. 3). Damit lag das gefundene Verhältnis dicht bei den Literaturangaben von 3 mol Cystein pro g Atom Metall (KÄGI et al., 1979; WEBB, 1975).

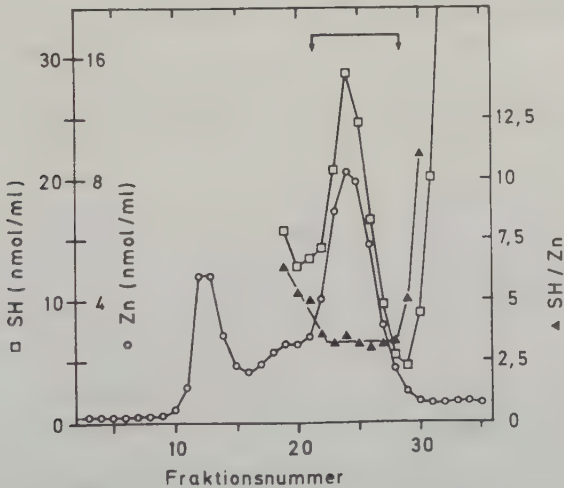


Abb. 3 Thiolatgruppenbestimmung in Metallothionein nach Sephadex G-75 Separation

Aus den Lebern von Zn-vorbehandelten (i.p., 3 x 10 mg Zn/kg einer Zinksulfat-Lösung) NMRI-Mäusen wurde das Zytosol eines 10%igen Homogenates in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 bereitet. Ein Aliquot von 1,5 ml, entsprechend 0,15 g Leberfrischgewicht, wurde auf eine 1,6 x 84 cm Sephadex G-75 Säule aufgetragen, und 5 ml Fraktionen wurden bei einer Flußgeschwindigkeit von 18 ml/h gesammelt. In den Fraktionen wurden die Thiolatgruppen (SH) und die Zn-Gehalte bestimmt, sowie deren Verhältnis gebildet. Die Position von Metallothionein ist durch Pfeile gekennzeichnet.

5f. Kadmium-Hämoglobin Bindungstest für Metallothionein

Der Test beruht auf der hohen Affinität von Metallothionein für Cd und der konstanten Cd/Protein Stöchiometrie. Ebenso nutzt er die Hitze-stabilität von Cd-Thionein zur Abtrennung anderer Gewebeproteine aus. Die Methodenentwicklung und die Störanfälligkeit des Tests durch Veränderung der zugesetzten Cd- und Hämoglobin-Mengen sowie durch Anwesenheit von Glutathion werden unter ERGEBNISSE 1 abgehandelt. Hier ist deshalb nur das Testprotokoll wiedergegeben.

In 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden geeignete Mengen an Gewebeextrakt (S 8, S 18, S 100; siehe MATERIAL UND METHODEN 5a) mit 30 mM Tris-HCl-

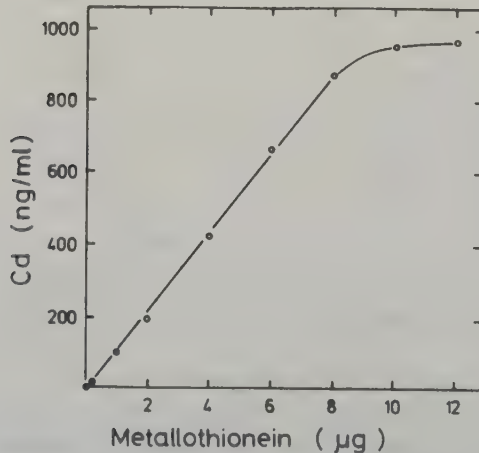


Abb. 4 Bestimmung des linearen Bereiches des Kadmium-Hämoglobin Bindungstestes

Verschiedene Mengen Zn-Thionein aus Rattenlebern (zur Präparation siehe MATERIAL UND METHODEN 6a) wurden in den Kadmium-Hämoglobin Bindungstest, unter Verwendung von 1400 ng Cd, entsprechend einer Endkonzentration von 1000 ng/ml, eingesetzt. Im hitzestabilen Überstand wurden die Cd-Konzentrationen bestimmt.

Puffer, pH 7,4 auf 1,1 ml ergänzt (für glutathionreiche Gewebe, wie Leber und Niere, betrug der Verdünnungsfaktor mindestens 20) und 5 min bei Raumtemperatur mit 10 μ l einer CdCl₂-Lösung (100 μ g Cd/ml) inkubiert. Nicht an Metallothionein gebundenes Cd wurde anschließend durch Hämoglobinzugabe (100 μ l einer 4%igen Lösung), Erhitzen (3 min bei 100°C) und Zentrifugieren (5 min bei 8 000 g) entfernt. Hämoglobinzugabe, Erhitzen und Zentrifugieren wurden zweimal im selben Reaktionsgefäß wiederholt. Im resultierenden klaren Überstand wurde danach der Cd-Gehalt bestimmt. Unter diesen Bedingungen wurde vom Meßwert ein nicht durch Hitze fällbarer Anteil von 2 ng Cd/ml abgezogen (Messwerte ab 20 ng/ml).

Die Metallothioneingehalte wurden meist auf das Frischgewicht der entsprechenden Gewebe bezogen. Die Berechnung erfolgte dabei nach folgender Formel:

$$\text{ng Metallothionein/mg Gewebe} = \frac{c_{\text{Cd}}}{c_{\text{Gew}}} \times f_V \times f_K$$

c_{Cd} : Cd-Konzentrationen im Überstand (ng/ml) abzüglich eines Leerwerts von 2 ng/ml

c_{Gew} : Gewebskonzentration (mg/ml) im Test

f_V : Verdünnungsfaktor des Tests (1410:1100 = 1,28)

f_K : Konversionsfaktor (8,39) aufgrund des Molekulargewichts von Metallothionein = 6 600, des Atomgewichts von Cd = 112,4 und des molaren Verhältnisses Cd/Metallothionein = 7

Der Test zeigte eine lineare Beziehung zwischen gereinigtem Zn-Thio-
nein (Mengenbestimmung über Thiolatgruppen, siehe MATERIAL UND METHO-
DEN 5e) aus Rattenlebern und dem gemessenen Cd im Überstand bis zu
8 μ g Metallothionein entsprechend 860 ng Cd/ml (Abb. 4).

6. Präparation und Stabilität von Metallothionein

6a. Präparation von Zn-Thionein

Zur Induktion von Zn-Thionein wurde Ratten an drei aufeinanderfolgenden Tagen eine Zinksulfat-Lösung i.p. injiziert (3×10 mg Zn/kg). Am vierten Tag wurde Zn-Thionein aus den Lebern der Tiere, in Anlehnung an die von BÜHLER und KÄGI (1974) vorgeschlagene Methode, isoliert.

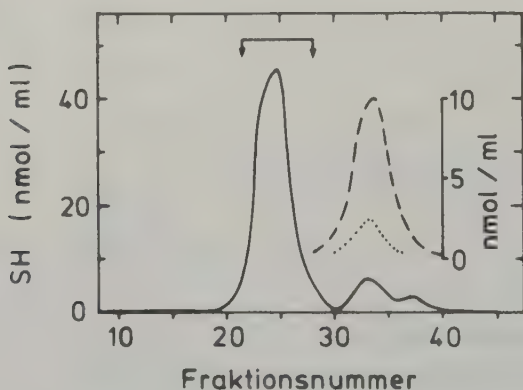


Abb. 5 Reinheitsprüfung von Zn-Thionein nach fraktionierter Ethanol-fällung

Zn-Thionein wurde aus den Lebern von Zn-vorbehandelten (3×10 mg Zn/kg einer Zinksulfat-Lösung) Wistar Ratten gewonnen und die von 2 Tieren erhaltene Menge in 28 ml H_2O aufgenommen. 1 ml dieser Lösung wurde auf einer $1,6 \times 84$ cm Sephadex G-75 Säule aufgetragen und 5 ml Fraktionen wurden bei einer Flußgeschwindigkeit von 18 ml/h gesammelt. In den Fraktionen wurden die Thiolatgruppen (SH, —) nach MATERIAL UND METHODEN 5e Glutathion und Glutathiondisulfidäquivalente (-----) nach TIETZE (1969) und Glutathiondisulfid (.....) nach SIES und SUMMER (1975) bestimmt. Die Position von Metallothionein ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Dazu wurde ein 20%iges Leberhomogenat in 1,15% KCl bereitet und bei 25°C 15 min mit Mercaptoethanol (0,002 Volumenteile) versetzt. Anschließend wurden 1,2 Volumenteile Ethanol und 0,092 Volumenteile Chloroform bei -20°C zugesetzt und 20 min bei 20 000 g im vorgekühlten Rotor zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde daraufhin mit 2 Volumenteilen Ethanol (-20°C) versetzt und erneut für 20 min bei 20 000 g zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das leicht gelbliche Präzipitat mit 10 ml Ethanol gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Danach wurde das Material in Wasser aufgenommen und durch 10 minütige Zentrifugation bei 20 000 g von wasserunlöslichen Anteilen befreit.

Zur Überprüfung der Reinheit des durch fraktionierte Ethanol-fällung gewonnenen Materials wurde ein Aliquot auf einer Sephadex G-75 Säule aufgetrennt. Die Analyse zeigte, daß 85% der Thiolatgruppen im Bereich von Metallothionein eluierten. Es konnte keine Verunreinigung durch hochmolekulare Proteine entdeckt werden, hingegen zeigten sich im niedermolekularen Bereich mitgeschleppte Verunreinigungen, die 15% der Thiolatgruppen enthielten. Hierbei handelte es sich um Glutathion und Glutathiondisulfid (Abb. 5).

Die fraktionierte Ethanol-fällung allein liefert also Metallothionein in einer Reinheit von ca. 85% auf der Basis der Thiolatgruppenmessung. Durch fraktionierte Ethanol-fällung und Sephadex G-75 Trennung wurde ausgehend von drei Rattenlebern üblicherweise 6-10 mg Zn-Thionein erhalten.

6b. Präparation von Cd-Thionein

Zur Induktion von Cd-Thionein wurde Ratten an drei aufeinanderfolgenden Tagen i.p. eine CdCl_2 -Lösung injiziert ($3 \times 1 \text{ mg Cd/kg}$). Am vierten Tag wurde die Leber entnommen und in 4 Volumenteilen 10 mM Tris-HCl-Puffer, $\text{pH } 7,4$ homogenisiert. Nach Zentrifugation bei $100\,000 \text{ g}$ wurde der Überstand erhitzt ($3 \text{ min, } 100^\circ\text{C}$) und erneut bei $8\,000 \text{ g}$ zentrifugiert. Zur vollständigen Cd-Sättigung wurde der klare Überstand bei Raumtemperatur 5 min mit einer CdCl_2 -Lösung ($180 \text{ } \mu\text{g Cd pro g verwendete Leber}$) inkubiert, und danach wurde überschüssiges Cd durch sechsmalige Zugabe einer 4%igen Hämoglobinlösung ($20 \text{ } \mu\text{l pro g verwendete Leber}$) und jeweiliges Erhitzen und Zentrifugieren entfernt. Nach Filtrieren und Einengen durch Ultrafiltration wurde das Material über eine Sephadex G-75 Säule gereinigt (Abb. 6).

Ausgehend von drei Rattenlebern wurde nach dieser Methode üblicherweise $12 \text{ mg Cd-Thionein}$ erhalten, dessen Zn-Verunreinigung weniger als $0,1\%$ des Cd-Anteils betrug.

6c. Präparation von Hg- und Ag-Thionein

Ausgehend von gereinigtem Zn-Thionein aus Rattenlebern (MATERIAL UND METHODEN 6a) wurde der Metallaustausch in vitro durchgeführt. Dazu wurde ein Aliquot Zn-Thionein ($3,3 \text{ } \mu\text{M}$, entsprechend $23,1 \text{ } \mu\text{M Zn}$) mit einem Überschuß an HgCl_2 oder AgNO_3 ($50 \text{ } \mu\text{M}$) mindestens 10 min in 100 mM Phosphatpuffer, $\text{pH } 7,4$, bei Raumtemperatur inkubiert. Für die durchgeführten Messungen der Reaktivität der Thiolatgruppen mit ELLMAN's Reagens (siehe MATERIAL UND METHODEN 5e) war es nicht nötig, das verdrängte Zn abzutrennen.

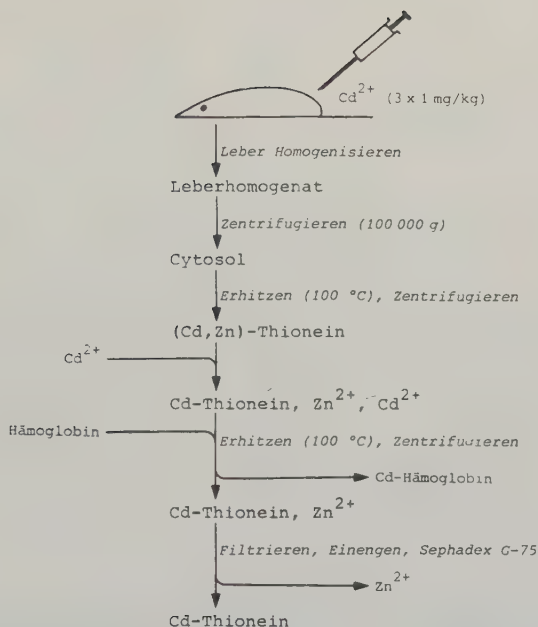


Abb. 6: Präparationschema für Cd-Thionein

6d. Oxidations- und Lagerstabilität von Metallothionein

Für Metallothionein wird aufgrund des hohen Cysteingehalts eine Oxidationsempfindlichkeit diskutiert (SUZUKI et al., 1983; SATO and MAGAI, 1980). So wird die Existenz von Metallothioneindimeren als Folge einer intermolekularen Cysteinverbrückung genauso beschrieben (SUZUKI et al., 1983; SUZUKI and YAMUMURA, 1980; SUZUKI et al., 1981) wie das Auftreten einer intramolekularen Cysteinverbrückung (SUZUKI und MAITANI, 1981). Durch die Zugabe von Antioxidantien wie Mercaptoethanol

wurde versucht, die resultierende Veränderung in der Metallbindung zu verhindern (BELL, 1979; MINKEL et al., 1980). Im Hinblick auf die beabsichtigte Thiolatgruppenmessung im Metallothionein sollte jedoch auf Mercaptoethanol und ähnliche thiolhaltige Antioxidantien verzichtet werden, da diese Substanzen die Messung überlagern würden.

Um mögliche oxidative Veränderungen in Metallothionein ohne Zusatz von Schutzreagenzien zu erfassen, wurde Leberzytosol von Zn-vorbehandelten Mäusen vor und nach fünftägiger Lagerung bei +4°C über eine Sephadex G-75 Säule aufgetrennt, und in den Fraktionen der Metall- und Thiolatgehalt bestimmt. Die Zn-Gehalte der Fraktionen ergaben in beiden Fällen ein nahezu identisches Bild (Abb. 7A). Auch die Gehalte an Thiolatgruppen in Metallothionein wurden durch die Lagerung nicht verändert. Demgegenüber zeigten sich im niedermolekularen Bereich des Chromatogramms (Fraktionen 31-40) nach der Lagerung nur noch wenige meßbare Thiolatgruppen (1% des ursprünglichen Gehaltes), was auf Oxidation von Glutathion zurückgeführt werden kann. Auch in den hochmolekularen Proteinen (Fraktionen 13-21) scheint der geringe Gehalt an Thiolatgruppen auf partielle Thiolatoxidation während des Lagerns hinzudeuten* (Abb. 7B).

Die relativ geringen Flußgeschwindigkeiten bei der Gelchromatographie bedingten Zeiten von bis zu 17 Stunden pro Chromatogramm. Dieser Zeitbedarf hatte in manchen Fällen ein mehrwöchiges Lagern von Probenmaterial zur Folge. Um dabei eventuell auftretende Veränderungen zu erfassen, wurde Leberzytosol mit hohem Metallothioneingehalt unter den üblichen Lagerbedingungen untersucht. Ein Aliquot des Zytosols von Zn-vorbehandelten NMRI-Mäusen wurde dazu entweder direkt nach der Präparation oder nach viermonatigem Lagern bei -18°C und zweimaligem Auf-

* Die Farbentwicklung der Proben mit ELLMAN's Reagens zur Thiolatbestimmung (405 nm) erreichte für hochmolekulare Proteine keinen stabilen Endwert. Dies wurde auf die mangelnde Zugänglichkeit der Thiolatgruppen in hochmolekularen Proteinen zurückgeführt (vergleiche ERGEBNISSE 5e und ELLMAN, 1959).

Nach fünftägigem Lagern der Fraktionen resultierte der Umsatz mit ELLMAN's Reagens in einem stabilen Absorptionswert nach 120 min.

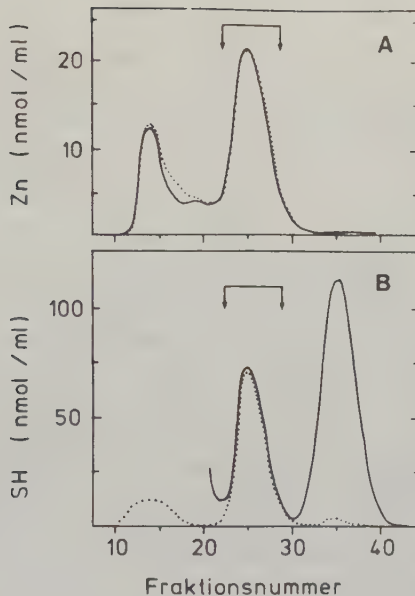


Abb. 7 Untersuchung der Oxidationsstabilität von Metallothionein

Aus den Lebern von zink-vorbehandelten NMRI-Mäusen (3×10 mg Zn/kg einer Zinksulfat-Lösung) wurde das Zytosol eines 20%igen Homogenates (w/v) in 20 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4 bereitet. Jeweils ein Aliquot von 2 ml des Zytosols, entsprechend 0,4 g Leberfrischgewicht, wurde auf eine Sephadex G-75 Säule (1,6 x 84 cm) aufgetragen. 5 ml Fraktionen wurden bei einer Flußgeschwindigkeit von 18 ml/h gesammelt, und deren Gehalte an Zn (A) und Thiolatgruppen (SH, B) bestimmt. Die Position von Metallothionein ist durch Pfeile gekennzeichnet.

— aufgetragenes Zytosol direkt nach dem Lauf gemessen
..... aufgetragenes Zytosol nach dem Lauf 5 Tage bei +4°C gelagert und danach gemessen

tauen auf eine Sephadex G-75 Säule aufgetragen. In den Fraktionen wurden die Zn-Gehalte gemessen. Jeder Metallverlust oder Proteinabbau müsste sich dabei durch Verringerung der Peakmaxima oder durch Auftreten neuer Peaks bemerkbar machen. Es konnten jedoch weder in den Me-

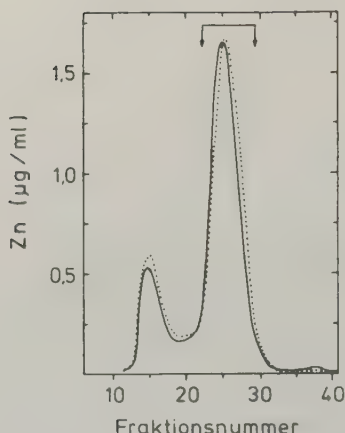


Abb. 8: Untersuchung der Stabilität von Metallothionein unter den üblichen Lagerbedingungen

Zn-Vorbehandlung von NMRI-Mäusen, Bereiten des Zytosols und Chromatographiebedingungen sind in Abb. 7 beschrieben. In den Fraktionen wurden jeweils die Zn-Gehalte bestimmt. Die Position von Metallothionein ist durch Pfeile gekennzeichnet.

— direkt aufgetragenes Zytosol
..... nach 4 Monaten Lagerung bei -18°C und zweimaligem Auftauen aufgetragenes Zytosol

tallothioneinfraktionen (23-29) noch in den Fraktionen der hochmolekularen Proteine (13-21) Veränderungen in den Zn-Gehalten nach der Lagerung festgestellt werden (Abb. 8).

7. Etablierte Zelllinien

7a. Herkunft und Kultivierung

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden ursprünglich aus einem gut differenzierten hepatozellulären Karzinom (H 35) isoliert

(PITOT et al., 1964), das in einer männlichen AxC Ratte durch Fütterung von Acetylaminofluoren erzeugt worden war (REUBER, 1961). Faza 967-, Fao-, 2sFou-, C2Rev7-, H5- und C2-Zellen wurden durch Klonierung gewonnen und die Linie H4IEC3/G⁻ durch Haltung in glukosefreiem Medium ausgelesen.

Aufgrund der Fähigkeit zur Expression leberspezifischer Funktionen, wie Sekretion von Albumin, Synthese der Isoenzyme von Alkohol-Dehydrogenase und Aldolase B, sowie der Induzierbarkeit von Tyrosin-Aminotransferase und Alanin-Aminotransferase durch Steroidhormone, wurden die Klone Faza 967, Fao, 2sFou, C2Rev7 und H4IEC3/G⁻ als differenzierte Zelllinien angesehen (DESCHATRETTE und WEISS, 1974; DESCHATRETTE et al., 1980). Im Gegensatz dazu fehlen die erwähnten leberspezifischen Funktionen den beiden Zelllinien H5 und C2, weshalb diese als weniger differenziert (dedifferenziert) bezeichnet wurden.

Die Aufbewahrung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff.

Zur Subkultivierung wurden 20×10^4 Zellen in 100 mm Plastik-Schalen ausgesät und in 7 ml HAM's F 12- und NCTC 135-Medium (1:1) unter Zusatz von 5% fötalem Rinderserum und Antibiotika (Penicillin, 100 Einheiten/ml; Streptomycin, 100 µg/ml) bei 37°C in einer Atmosphäre von 93% Luft und 7% CO₂ gehalten. Medienwechsel erfolgte alle 2 Tage.

7b. Inkubation mit CdCl₂ und Aufarbeitung

Zur Bestimmung der zytosolischen Metallverteilung wurden Zellen 7 Tage nach Rekultivierung verwendet, nachdem sich ein Zellrasen gebildet hatte. Die Zellen wurden mit CdCl₂ in einer Endkonzentration von 0,5 oder 2,0 µM bei 37°C inkubiert. Nach 18 h wurden die Platten dreimal mit 5 ml eiskaltem 30 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, gewaschen und die Zellen jeweils in 0,25 ml des gleichen Puffers aufgenommen. Vereintes Material von 3 Kulturplatten wurde dreimal für 10 sec sonifiziert. 20 µl des resultierenden Zellhomogenats wurden zur Protein-

bestimmung verwendet und der Rest wurde für 1 h bei 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Die chromatographische Auftrennung der löslichen Proteine erfolgte über eine $0,9 \times 11 \text{ cm}$ Sephadex G-75 Säule (siehe MATERIAL UND METHODEN 5d).

7c. Messung der Zytotoxizität nach Inkubation mit CdCl_2

Zur Bestimmung der Zytotoxizität wurden 8×10^4 Zellen der Linien Faza 967, Fao, 2sFou, C2Rev7 und H4IIEC3/G⁻ beziehungsweise 4×10^4 Zellen der Linien H5 und C2 7 Tage nach Rekultivierung mit CdCl_2 in einer Endkonzentration von 1, 3, 10 oder $20 \mu\text{M}$ inkubiert. Nach 18 h wurden die Zellen einmal mit 5 ml Cd-freiem PBS-Puffer gewaschen und mit 2,5 ml einer Trypsinlösung (0,05% Trypsin und 0,02% EDTA in PBS) geerntet. Sie wurden auf eine Dichte von 100 Zellen/ 21 cm^2 verdünnt und danach bei 37°C in einer Atmosphäre von 93 % Luft und 7 % CO_2 inkubiert. 1 oder 2 Wochen später wurden die gebildeten Kolonien nach Anfärben mit MAYER's Hämalaun gezählt.

8. Frisch isolierte Zellsysteme

8a. Präparation von Hepatozyten

Hepatozyten wurden in Anlehnung an die von BERRY und FRIEND (1969) vorgeschlagene Methode aus Rattenlebern isoliert, die mit Kollagenase-haltigem Medium perfundiert worden waren (zur Leberperfusion siehe BÜCHER et al., 1972). Es wurde nach 10 min Perfusion mit Ca-freiem Medium mit 100 ml Ca-haltigem Medium unter Kollagenasezusatz (50 mg/100 ml) bei einer Geschwindigkeit von 3-4 ml pro min pro g Leber 10 bis 20 min im geschlossenen System perfundiert. Gegen Ende wurde bei stark abnehmendem Durchfluß die Perfusionsrichtung umgekehrt

und nochmals 5-10 min perfundiert. Danach wurde die Leber in eine Schale mit 50 ml Carbogen-begastem Medium überführt (0°C) und die Leberzellen nach Einritzen der Leberkapsel durch leichtes Schütteln herausgelöst. Die durch ein Gaze-Filter (150 μ m) filtrierte Zellen wurden einmal mit Ca-freiem und zweimal mit Ca-haltigem Medium gewaschen (jeweils 1 min Zentrifugation bei 50 g und Verwerfen des Überstandes). Zur Beurteilung der Zellpräparationen wurde die Trypanblau-Anfärbbarkeit überprüft und für die Versuche nur Präparationen verwendet, bei denen der Farbstoff von mehr als 85% der Zellen ausgeschlossen wurde.

Hepatozyten mit erhöhtem Zn-Thioneingehalt wurden mit der gleichen Methode aus Ratten erhalten, die 18 h vor Beginn der Präparation mit einer Zinksulfat-Lösung (10 mg Zn/kg) i.p. injiziert worden waren. Dabei mußte die Kollagenase-Perfusionszeit um etwa 5-10 min verlängert werden, um die Gewebsauflösung zu erreichen.

8b. Präparation von Nierentubuluszellfragmenten

Die Zellfragmente wurden aus den Nieren von 180-200 g schweren Wistar Ratten nach der Methode von GUDER (1979) gewonnen. Nach Perfusion der Nieren und Herauspräparieren des Nierenrindenmaterials wurde die Gewebsauflösung durch 30-minütige Inkubation bei 37°C unter Zusatz von 10 ml Krebs-Henseleit-Puffer und 7 mg Kollagenase pro g Gewebe erzielt. Mit dieser Methode wurden Tubulusfragmente, bestehend aus etwa 30-50 Zellen pro Fragment, erhalten.

Nierentubulusfragmente mit erhöhtem Zn-Thioneingehalt wurden mit der gleichen Methode aus Ratten erhalten, die 18 h vor Beginn der Präparation mit einer Zinksulfat-Lösung (10 mg Zn/kg) i.p. injiziert worden waren.

8c. Bestimmung der Cd-Aufnahme und -Verteilung in Hepatozyten nach Inkubation mit CdCl_2 und Cd-Thionein

Hepatozyten wurden in einer Konzentration von 12 mg Protein/ml, entsprechend 5×10^6 Zellen/ml mit $44 \mu\text{M}$ Cd als CdCl_2 oder Cd-Thionein in mindestens 30 ml Kulturmedium bei 37°C unter leichtem Schütteln und Carbogen-Begasung inkubiert. Nach 15, 30, 60 und 100 min wurden jeweils 5 ml abpipettiert und die Zellen 1 min bei 50 g abzentrifugiert und dreimal mit 5 ml Medium gewaschen. Die pelletierten Zellen (etwa 0,5 ml) wurden daraufhin mit Kulturmedium auf 2,1 ml aufgefüllt und sonifiziert. 0,5 ml des erhaltenen Homogenats wurden zur Messung des Gesamt-Cd-Gehaltes der Zellen abgenommen und der Rest wurde für 1 h bei 100 000 g zentrifugiert. Der Überstand (S 100) wurde abpipettiert und in 2 gleiche Portionen geteilt und das Pellet wurde einmal mit 0,8 ml H_2O gewaschen. Im Pellet und in einer Portion des S 100-Überstandes wurde der Cd-Gehalt nach Veraschung und in der zweiten S 100-Portion wurde der hitzestabile Cd-Anteil ($2 \times 100^\circ\text{C}$) ohne vorherige Veraschung bestimmt. Dabei veränderte die Zugabe von Hämoglobin (0,1 ml einer 4%igen Lösung) vor dem Erhitzungsschritt den Gehalt an hitzestabilem Cd im S 100-Überstand nicht.

8d. Beeinflussung der Glukoneogenese in Nierentubuluszellfragmenten nach Inkubation mit CdCl_2 und Cd-Thionein

Frisch präparierte Nierentubuluszellfragmente (MATERIAL UND METHODEN 8b) wurden auf 12 mg Protein/ml verdünnt. Jeweils 1,0 ml der Zellsuspension wurde mit 0,1 ml einer Lösung von CdCl_2 oder Cd-Thionein vereint, um folgende Endkonzentrationen zu erhalten; Protein: 11 mg/ml; Cd: 2, 10, 44 und $200 \mu\text{M}$. Anschließend wurde mit Carbogen begast und das verschlossene Gefäß unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach 15, 30 und 60 min wurde jeweils ein Aliquot von 0,1 ml entnommen und mit 0,8 ml Krebs-Henseleit-Puffer und 0,1 ml Pyruvat (100 mM) versetzt. Erneut wurde mit Carbogen begast und bei 37°C unter Schütteln

inkubiert. Die Reaktion wurde nach 30 min durch Zugabe von 0,1 ml Perchlorsäure (35%) gestoppt und die gebildete Glukose nach BERGMEYER et al. (1970) bestimmt. Die enzymatische Glukose-Bestimmung wurde durch eine Cd-Konzentration unterhalb von 500 μM nicht beeinflusst.

9. Auswertung der Versuche und statistische Verfahren

Wenn nicht anders angegeben, sind die in dieser Arbeit dargestellten Meßpunkte Mittelwerte aus zwei identischen Ansätzen. Bei mehr als zwei Parallelproben wurde neben dem Mittelwert auch die Standardabweichung s angegeben, die sich nach folgender Formel berechnet:

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$x_i - \bar{x}$: Abweichung des i -ten
Einzelwertes vom Mittelwert

Bei den menschlichen Nierenrindenproben (siehe ERGEBNISSE 4b) wurde wegen der großen Streubreite der Median als geometrisches Mittel der linearisierten Meßwerte einer Gruppe angegeben. Zur Verdeutlichung wurden zusätzlich sämtliche Einzelwerte in Abb. 24 dargestellt.

Signifikanzen wurden mit dem STUDENT-t-Test zum Vergleich zweier Mittelwerte (BROWNLEE, 1965) oder dem nichtparametrischen WILCOXON-Test (CONOVER, 1980) berechnet.

ERGEBNISSE

1. Ausarbeitung des Kadmium-Hämoglobin Bindungstestes zum raschen und empfindlichen Nachweis von Metallothionein und Untersuchung des Einflusses von Glutathion auf den Test

Cd bindet mit hoher Affinität an Metallothionein. Die Assoziationskonstante beträgt 10^{22} M^{-1} (VASAK und KÄGI, 1983). Diese Eigenschaft in Verbindung mit der Austauschbarkeit der Metalle im Metallothionein spricht dafür, das Protein mit Cd zu titrieren.

Cd-Sättigungsmethoden zur Bestimmung von Metallothionein wurden zuerst von PROBST et al. (1977) angewandt. Unter den dabei gewählten Bedingungen beobachtete BELL (1979) keine vollständige Cd-Sättigung im Metallothionein und empfahl deshalb, die Summe der gebundenen Metalle (restliches endogenes Zn und neugebundenes Cd) zur Quantifizierung heranzuziehen. ONOSAKA et al. (1978) verwandten ebenfalls eine Cd-Sättigungsmethode und trennten überschüssiges Cd durch Zugabe eines Kaninchenblut Hämolysates und anschließendes Erhitzen ab. Dieser Test, der eine gute Korrelation mit einer polarographischen Bestimmungsmethode ergab, war sensitiv genug, Metallothioneingehalte über $40 \mu\text{g/g}$ Frischgewicht zu messen (ONOSAKA und CHERIAN, 1982a).

Als Grundvoraussetzung einer Cd-Sättigungsmethode galt es zuerst zu klären, ob das endogen gebundene Zn im Metallothionein quantitativ verdrängt werden kann. Dazu wurde Leberzytosol von Zn-vorbehandelten Ratten vor und nach Cd-Sättigung über eine Sephadex G-75 Säule aufgetrennt. Cd- und Zn-Bestimmungen in den Fraktionen zeigten, daß der Metallaustausch unter den gewählten Bedingungen quantitativ ist (Abb. 9).

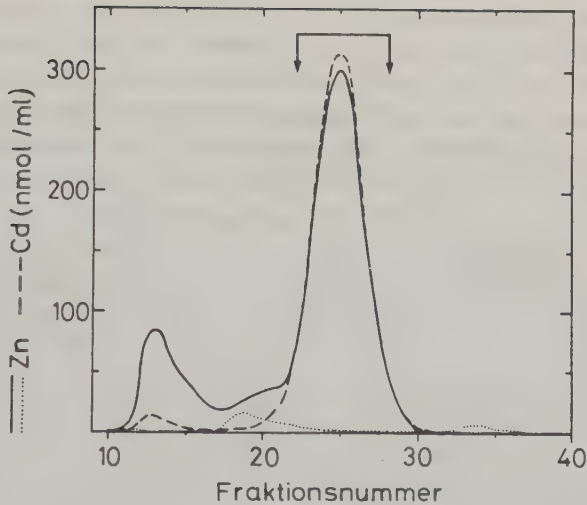


Abb. 9 Sephadex G-75 Elutionsprofile von Leberzytosol Zn-vorbehandelter Ratten vor und nach Cd-Sättigung

Leberzytosol von Zn-vorbehandelten Ratten (i.p., 3 x 10 mg Zn/kg einer Zinksulfat-Lösung) wurde auf einer 1,6 x 84 cm Sephadex G-75 Säule aufgetrennt (Flußgeschwindigkeit 18 ml/h, 5 ml Fraktionen). Ein Aliquot des nativen Zytosols, entsprechend 0,3 g Leberfrischgewicht wurde auf die Säule aufgetragen und in den Fraktionen die Zn-Gehalte (—) bestimmt. Ein zweites Aliquot wurde mit Cd (doppelte molare Menge des Thionein-gebundenen Zn) versetzt und für 3 min auf 100°C erhitzt. Nach Abzentrifugieren der denaturierten Proteine wurde ein Aliquot, entsprechend 0,3 g Leberfrischgewicht auf die Säule aufgetragen und die Zn- (.....) und Cd- (-----) Gehalte in den Fraktionen bestimmt. Die Position von Metallothionein ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Anstelle des von ONOSAKA et al. (1978) verwendeten Hämolysates zur Abtrennung von überschüssigem Cd war es vorteilhaft, eine Hämoglobin-Lösung zu verwenden, weil sie schneller zu bereiten, besser zu standardisieren und länger zu lagern war. Infolge der Hitzestabilität von Cd-Thionein wird es beim Kochen nicht denaturiert und bleibt in Lösung, während überschüssiges Cd zusammen mit dem denaturierbaren Hämoglobin präzipitiert. Die Vollständigkeit der Cd-Fällung durch Hämoglobin wurde entsprechend dem in MATERIAL UND METHODEN 5f angegebenen Testprotokoll durch Variation der Cd und Hämoglobin-Zugabe überprüft (Abb. 10). Als optimale Testbedingungen erwiesen sich dabei

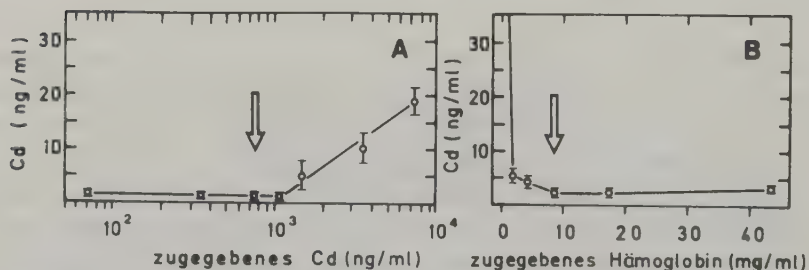


Abb. 10 Leerwertbestimmung des Kadmium-Hämoglobin Bindungstestes durch Variation der eingesetzten Cd- und Hämoglobinemengen

Entsprechend dem in MATERIAL UND METHODEN 5f angegebenen Testprotokoll wurden verschiedene Mengen an eingesetztem Cd und eingesetztem Hämoglobin dreimal auf 100°C erhitzt und anschließend von denaturiertem Protein durch Zentrifugation befreit. In einer Versuchsreihe wurden 12 mg Hämoglobin, entsprechend einer Endkonzentration von 8,6 mg/ml mit verschiedenen Mengen an Cd (A) und in einer zweiten Versuchsreihe 1000 ng Cd, entsprechend einer Endkonzentration von 740 ng/ml mit verschiedenen Mengen an Hämoglobin (B) verwendet. Die Abszissenwerte bezeichnen dabei die Endkonzentrationen im Test. In beiden Fällen wurden die Cd-Konzentrationen im hitzestabilen Überstand bestimmt. Die Bedingungen, die für den Routinetest gewählt wurden, sind durch Pfeile gekennzeichnet.

eine zugegebene Cd-Menge von 1000 ng, entsprechend einer Endkonzentration von 740 ng/ml und eine zugegebene Hämoglobin-Menge von 12 mg, entsprechend einer Endkonzentration von 8,6 mg/ml. Es ist bemerkenswert, daß Hämoglobin auch nach der Strukturänderung beim Denaturieren noch eine genügend hohe Affinität für Cd besitzt, um das Metall aus der Lösung zu entfernen. Dies läßt vermuten, daß die Cd-Bindung über hydrophile Gruppen an der Moleküloberfläche erfolgt, eventuell über die Cysteine in den β -Untereinheiten. Auch in Abwesenheit von Metallothionein wurde in dem Test ein nicht hitzepräzipitierbarer Cd-Anteil von 2 ng/ml gefunden. Dieser Leerwert dürfte durch Cd hervorgerufen werden, das an nicht hitzepräzipitierbare Hämoglobinanteile bindet, weil der hitzestabile Überstand noch 2 % des zugesetzten Proteins enthält.

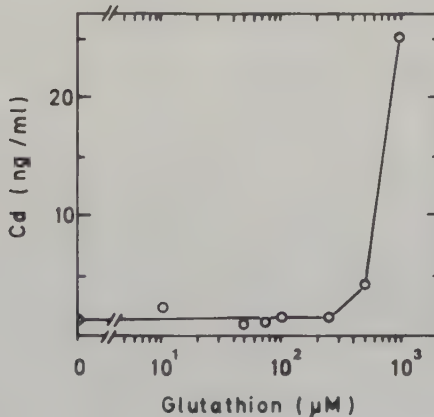


Abb. 11 Einfluß von Glutathion auf den Leerwert des Kadmium-Hämoglobin Bindungstestes

Entsprechend dem in MATERIAL UND METHODEN 5f angegebenen Testprotokoll wurden 1000 ng Cd und 12 mg Hämoglobin unter Zusatz verschiedener Mengen an Glutathion (Abszissenangaben bezeichnen die Endkonzentrationen im Test) auf 100°C erhitzt und von denaturiertem Protein durch Zentrifugation befreit. Im hitzestabilen Überstand wurden die Cd-Konzentrationen bestimmt.

Einige niedermolekulare hitzestabile Bestandteile der Gewebe, insbesondere Thiolat-haltige Komponenten, sind zur Metallkomplexierung befähigt. Da Glutathion die mengenmäßig bedeutendste niedermolekulare Thiolat-haltige Verbindung in Säugetierzellen ist und es mit den Gewebeeextrakten in den Test eingebracht wird, wurde der Einfluß dieses Peptids auf den Leerwert des Kadmium-Hämoglobin Bindungstestes bestimmt. Dazu wurden jeweils 1000 ng Cd und 12 mg Hämoglobin in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen an Glutathion in den Test eingesetzt. Erst oberhalb 0,5 mM Glutathion im Test wurde der Leerwert deutlich erhöht (Abb. 11). Es muß deshalb darauf geachtet werden, diese Konzentration im Test nicht zu überschreiten. Bei Verwendung von Glutathion-reichen Geweben wie Leber, bei der Glutathionkonzentrationen bis 10 mM vorkommen, erfüllt ein Verdünnungsfaktor von 1:20 diese Voraussetzung.

Der Test war sensitiv genug, Metallothioneingehalte von mehr als 2 µg/g Frischgewicht zu bestimmen. Die Meßempfindlichkeit reichte damit aus, das Protein in elf bisher untersuchten Geweben von Säugetieren zu erfassen (siehe ERGEBNISSE 3a,b,c).

2. Metallothionein in Zellsystemen in vitro

2a. Induktion von Metallothionein und zytosolische Cd-Verteilung in etablierten Zelllinien nach Inkubation mit CdCl₂

Die Fähigkeit zur Metallothioneinsynthese ist ein wichtiger Parameter, der die Sensitivität der Zellen gegenüber Cd bestimmt (GICK et al., 1981). Cd ist einer der effektivsten Induktoren für Metallothionein, jedoch zeigte es von zwölf untersuchten Metallen die höchste Toxizität in permanenten Zellkulturen (TAN et al., 1984). Die Induzierbarkeit der Metallothioneinsynthese war in verschiedenen Säugetierzellen unterschiedlich (KOBAYASHI und KIMURA, 1980). In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Induzierbarkeit von Metallothionein und die daraus resultierende zytosolische Cd-Verteilung in verschiedenen Hepatomzelllinien der Ratte nach Inkubation mit CdCl₂ untersucht.

Zur Abschätzung nicht toxischer Dosen wurde die Zytotoxizität von CdCl₂ in den sieben verwendeten Zelllinien unter den beabsichtigten Inkubationsbedingungen bestimmt. Bis zu einer Cd-Konzentration von 3 µM im Medium konnte keine deutliche Verringerung der Zahl überlebender Zellen beobachtet werden. Die beiden dedifferenzierten Zelllinien C2 und H5 (siehe MATERIAL UND METHODEN 7a) zeigten bei höheren Konzentrationen die größte Resistenz gegenüber Cd. Am empfindlichsten erwies sich demgegenüber die differenzierte Zelllinie C2Rev7 (Abb. 12).

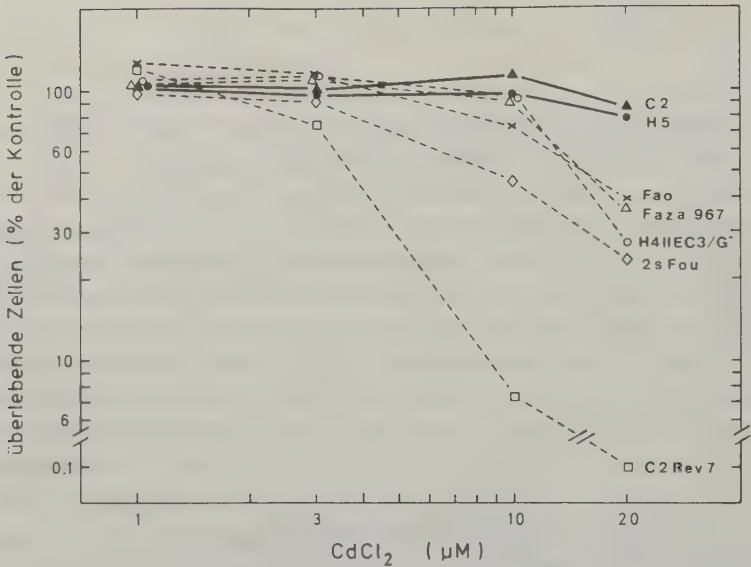


Abb. 12 Zytotoxizität von CdCl₂ in verschiedenen Hepatom-Zelllinien der Ratte

Die Zelllinien wurden für 18 h mit verschiedenen Konzentrationen an CdCl₂ inkubiert. Anschließend wurde die Anzahl der überlebenden Zellen ('Cloning efficiency') bestimmt (MATERIAL UND METHODEN 7c). Die Anzahl der überlebenden Zellen in den Kontroll-Zelllinien ohne Cd-Zusatz wurde jeweils als 100% gesetzt. Sie betrug für C2: 30%; H5: 41%; Fao: 30%; Faza 967: 28%; H4IIEC3/G⁻: 27%; 2s Fou: 40%; C2 Rev 7: 42%.

Bei Konzentrationen von 0,5 und 2,0 µM Cd, unter denen sich noch keine Zytotoxizität zeigte, war nach 18 stündiger Inkubation sowohl die Cd-Bindung an hochmolekulare Proteine als auch an Metallothioneine in den dedifferenzierten Zellen geringer als in den differenzierten Zellen (Tab. 4). Diese Befunde stehen in Einklang mit der von GICK und McCARTY (1983) in CHO-Zellen gemachten Beobachtung, wonach eine Cd-resistente Subpopulation weniger Cd akkumulierte als die Wildtypzellen.

Tab. 4 Cd-Gehalte in zytosolischen hochmolekularen Proteinen und in Metallothionein 18 h nach Inkubation verschiedener Hepatom-Zelllinien mit CdCl₂

Die Zellen wurden mit CdCl₂ inkubiert (MATERIAL UND METHODEN 7b) und das Zytosol auf einer 0,9 x 11 cm Sephadex G-75 Säule aufgetrennt. Als hochmolekularer Anteil (HMW; $M_r > 10\,000$) wurden die Fraktionen mit einem relativen Elutionsvolumen $V_e/V_0 = 1,0-1,8$ bezeichnet. Metallothionein (MT) eluierte bei $V_e/V_0 = 1,8-2,3$.

	Kontrolle		0,5 μ M CdCl ₂		2,0 μ M CdCl ₂	
	HMW	MT	HMW	MT	HMW	MT
Zelllinie	Cd-Gehalt (ng/mg Protein)					
C2	<2,5	<2,5	<2,5	25,6 $\pm$ 15,6	4,2 $\pm$ 2,4	54,2 $\pm$ 8,1
H5	<2,5	<2,5	5,4 $\pm$ 0,9	9,1 $\pm$ 2,6	3,1 $\pm$ 1,2	29,4 $\pm$ 6,7
Fao	<2,5	<2,5	4,3 $\pm$ 2,7	61,2 $\pm$ 4,0	11,2 $\pm$ 3,7	250,6 $\pm$ 83,2
FAZA 967	<2,5	<2,5	10,6 $\pm$ 8,6	74,7 $\pm$ 26,4	16,8 $\pm$ 9,4	165,6 $\pm$ 20,0
H4IIEC3/G ⁻	<2,5	<2,5	<2,5	19,4 $\pm$ 6,5	20,5 $\pm$ 6,8	233,9 $\pm$ 52,6
2sFoü	<2,5	<2,5	4,3 $\pm$ 0,1	40,0 $\pm$ 17,4	14,8 $\pm$ 8,6	228,2 $\pm$ 38,6
C2Rev7	<2,5	<2,5	<2,5	25,2 $\pm$ 3,0	18,9 $\pm$ 10,3	266,1 $\pm$ 86,8

18 h nach Inkubation der Zellen mit 2 μ M Cd war der größte Teil (>90%) des zytosolischen Cd an Metallothionein gebunden. Zur Klärung der Frage, ob hierbei das Protein auch maximal induziert war, wurde eine Zelllinie (H4IIEC3/G⁻) über drei Monate mit steigenden Cd-Konzentrationen bis 20 μ M inkubiert. Die "Cd-adaptierten" Zellen wurden dann aus dem Inkubationsmedium geerntet und die zytosolische Cd-Verteilung bestimmt. Die an Metallothionein gebundene Cd-Menge lag mit 1400 ng/mg Protein etwa dreieinhalbmals so hoch wie in der ursprünglichen Zelllinie bzw. den "Cd-adaptierten" Zellen nach vierwöchigem Wachstum im Cd-freien Medium. Demgegenüber zeigten sich in den Cd-Gehalten der hochmolekularen Proteine keine größeren Unter-

Tab. 5 Cd-Gehalte in zytosolischen hochmolekularen Proteinen (HMW) und in Metallothionein (MT) der ursprünglichen Zelllinie H4IIEC3/G⁻ und ihrer "Cd-adaptierten" Zellpopulationen nach Inkubation mit 20 μ M CdCl₂

Die zytosolische Cd-Verteilung in der ursprünglichen Zelllinie wurde 18 h nach Inkubation mit CdCl₂ bestimmt. "Cd-adaptierte" Zellen wurden während drei Monaten an das Wachstum in 20 μ M CdCl₂ gewöhnt. In einem Teil dieser Subpopulation wurde die zytosolische Cd-Verteilung unmittelbar im Anschluß an das dreimonatige Wachstum in 20 μ M Cd bestimmt und in einem anderen Teil nach vierwöchigem Wachstum in Cd-freiem Medium und erneuter 18-stündiger Inkubation (Einzelheiten siehe Legende zu Tab. 4).

H4IIEC3/G ⁻ Zellpopulation	HMW	MT
	Cd-Gehalt (ng/mg Protein)	
ursprüngliche Zelllinie	88 $\pm$ 80	389 $\pm$ 54
"Cd-adaptierte" Zellen	83 $\pm$ 6	1401 $\pm$ 150
"Cd-adaptierte" Zellen nach 4 Wochen in Cd- freiem Medium	52 $\pm$ 14	419 $\pm$ 20

schiede zwischen den drei Zellpopulationen (Tab. 5). Das heißt, daß durch 18-stündige Inkubation mit 2 μ M Cd zumindest in der Zelllinie H4IIEC3/G⁻ Metallothionein noch nicht maximal induziert war.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß verminderte Zytotoxizität von Cd in den dedifferenzierten Zelllinien C2 und H5 einhergeht mit geringerer Cd-Aufnahme und geringerer Metallothioneinsynthese. Diese Ergebnisse legen den Schluß nahe, daß die höhere Resistenz der beiden dedifferenzierten Zelllinien gegenüber Cd nicht durch Neusynthese von Metallothionein bedingt ist, sondern eher durch geringeren Cd-Gehalt im Zytosol und verminderte Bindung von Cd an hochmolekulare Proteine.

2b. Cd-Aufnahme und Beeinflussung der Glukoneogenese in frisch isolierten Zellen nach Inkubation mit $CdCl_2$ und Cd-Thionein

Von einer akut verabreichten Cd-Dosis akkumuliert etwa die Hälfte rasch in der Leber (PERRY et al., 1970; SASSER und JARBOL, 1977), andererseits stellt bei chronischer Exposition die Niere das Zielorgan der Cd-Toxizität dar (FRIBERG et al., 1974). In beiden Fällen hängt die Wirkung des Schwermetalles von seiner Bindungsform ab, und beim systemischen Transport sowie bei der intrazellulären Bindung von Cd stellt Metallothionein eine wichtige Einflußgröße dar (NIEHS, 1984; FOULKES, 1982). Deshalb wurde das Verhalten von Cd-Thionein und $CdCl_2$ verglichen, indem die Cd-Aufnahme und -Verteilung in Hepatozyten und die Beeinflussung der Glukoneogenese in Nierentubuluszell-

Tab. 6 Metallothioneingehalte in Hepatozyten und Nierentubuluszellfragmenten ohne und mit Zn-Vorbehandlung der Ratten

Die Zellen wurden frisch aus Wistar Ratten präpariert (MATERIAL UND METHODEN 8a und 8b) und die Metallothioneingehalte mit dem Kadmium-Hämoglobin Bindungstest bestimmt (MATERIAL UND METHODEN 5f).

Zell- präparation	ohne Vorbehandlung der Ratten	18 h nach Vorbehandlung der Ratten mit	
		10 mg Zn/kg	20 mg Zn/kg
		pmol Metallothionein/mg Protein	
Hepatozyten	5,2 $\pm$ 1,3	361 $\pm$ 11	525 $\pm$ 19
Nierentubulus- zellfragmente	21,2 $\pm$ 2,0	226 $\pm$ 50	n.b. ^a

^a nicht bestimmt

fragmenten bestimmt wurde. Dabei interessierten nicht nur mögliche Unterschiede im Verhalten der beiden Cd-Verbindungen im Inkubationsmedium, sondern auch der Einfluß erhöhter Metallothioneingehalte (Zn-Thionein) in den Zellen selbst.

Die basalen Metallothioneingehalte betrugen $5,2 \pm 1,3$ bzw. $21,0 \pm 2,0$ pmol/mg Protein in Hepatozyten bzw. Nierentubuluszellfragmenten. Vorbehandlung der Ratten mit Zn erhöhte diese Werte auf das 70- bis 100-fache in Hepatozyten bzw. das 10-fache in Nierentubuluszellfragmenten (Tab. 6). Die basalen Metallothioneingehalte in beiden Systemsystemen waren etwa halb so groß wie in dem frisch homogenisierten Material der Ausgangsorgane (vergleiche ERGEBNISSE 3a).

Bei den Inkubationen von Hepatozyten mit CdCl_2 und Cd-Thionein in einer Cd-Endkonzentration von $44 \mu\text{M}$ nahm der Cd-Gehalt der Zellen zeitabhängig zu, wobei der Anstieg zu Beginn der Inkubation am stärksten war. Dabei akkumulierte in den Zellen von unbehandelten Ratten nach 100 min Inkubation 315 bzw. 105 ng Cd/mg Protein aus CdCl_2 und Cd-Thionein, entsprechend 75 bzw. 25% der dem Medium zugesetzten Cd-Menge (Abb. 13A,B). Von den Hepatozyten aus Zn-vorbehandelten Ratten wurden bei analogem Testansatz 197 bzw. 88 ng Cd/mg Protein nach Inkubation mit CdCl_2 bzw. Cd-Thionein aufgenommen, entsprechend 47 bzw. 21% der zugesetzten Cd-Menge (Abb. 13C,D). In allen Fällen fand sich etwa ein Fünftel der jeweils aufgenommenen Cd-Menge im Zytosol wieder. Während der Cd-Gehalt im Zytosol bei den Hepatozyten aus unbehandelten Ratten durch Erhitzen fast verschwand, konnte er bei den Zellen aus Zn-vorbehandelten Ratten nicht verringert werden.

Dies deutet darauf hin, daß bei den Hepatozyten mit relativ geringem basalen Zn-Thionein-Gehalt aufgenommenes Cd im Zytoplasma überwiegend an hitzelabile Proteine (hochmolekulare Proteine) gebunden vorlag. Bei Hepatozyten von Zn-vorbehandelten Ratten war das aufgenommene Cd im Zytoplasma fast ausschließlich an hitzestabile Proteine gebunden. Als Ursache hierfür könnte der Zn-Cd-Austausch im hitzestabilen Metallothionein in Frage kommen. Somit könnte Metallothionein eine intrazelluläre Schutzfunktion zukommen, die eine Cd-Bindung an lösliche Enzyme und deren mögliche Hemmung verhindern könnte, solange das

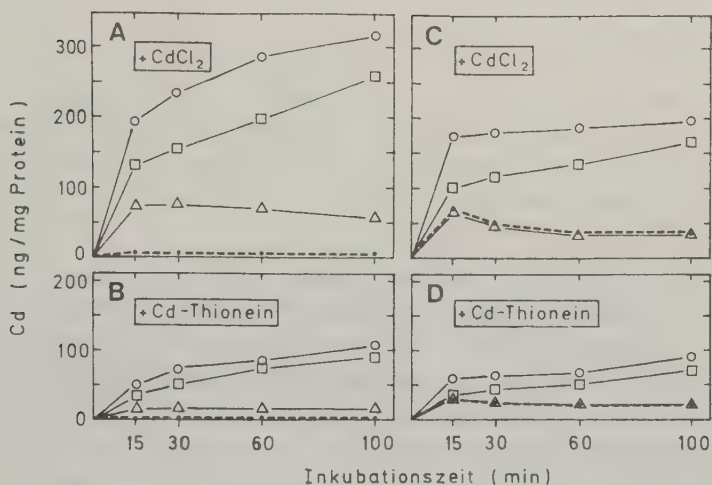


Abb. 13 Cd-Aufnahme und -Verteilung in Hepatozyten von unbehandelten (A,B) und Zn-vorbehandelten (C,D) Ratten nach Inkubation mit CdCl₂ und Cd-Thionein

Die Hepatozyten wurden isoliert (MATERIAL UND METHODEN 8a) und nach Verdünnung auf 12 mg Protein/ml mit CdCl₂ (A,C) oder Cd-Thionein (B,D) in einer jeweiligen Endkonzentration von 44 μ M Cd verschiedene Zeiten bei 37°C inkubiert (Einzelheiten siehe MATERIAL UND METHODEN 8c).

- Cd-Gehalte in der gesamten Zelle
- Cd-Gehalte in den unlöslichen Zellbestandteilen (Pellet nach 100 000g)
- △ Cd-Gehalte im Zytosol (Überstand nach 100 000g)
- Cd-Gehalte im erhitzten Zytosol (3 min, 100°C)

Schwermetall an Thionein gebunden ist. Extrazellulär angebotenes Thionein-gebundenes Cd wird allerdings in geringerem Maße in die Zellen aufgenommen als Cd in anorganischer Form. Faktoren, wie die Cd-Bindungsform, scheinen also einen größeren Einfluß auf die Cd-Aufnahme auszuüben als die endogenen Metallothioneingehalte.

Die Cd-Akkumulation war bei den Hepatozyten aus Zn-vorbehandelten Ratten geringer als bei den Präparationen aus unbehandelten Tieren (Abb. 13). Diese Befunde an Hepatozyten mit etwa 70-fach erhöhten Metallothioneingehalten (siehe Tab. 6) decken sich mit den an Cd-resistenten CHO-Zellen (mit erhöhtem Metallothioneingehalt) gewonnenen Erkenntnissen, da in den letzteren Zellen weniger Cd akkumulierte als in den Wildtypzellen (CORRIGAN und HUANG, 1983; GICK und McCARTY, 1983).

STACEY und KLAASSEN (1980) beschrieben, in Übereinstimmung mit den hier vorliegenden Ergebnissen, eine biphasische Cd-Aufnahme aus CdCl_2 in Hepatozyten. Diese Aufnahme war im Bereich zwischen 25 und 800 μM nicht sättigbar und auch nicht durch metabolische Inhibitoren, wie z.B. Kaliumcyanid hemmbar. Die Cd-Aufnahme in isolierte Hepatozyten scheint deshalb keinen aktiven Prozess darzustellen.

Das Verhältnis von zytosolischem und an unlösliche Zellbestandteile gebundenem Cd nimmt bei steigenden Inkubationszeiten ab. Dies deutet auf eine teilweise Cd-Umverteilung vom Zytosol zu den unlöslichen Komponenten hin. Die Vorgänge die hierzu führen könnten, umfassen auch zwischenzeitliche Cd-Freisetzung durch lysosomalen Abbau von Cd-Thionein (SQUIBB und FOWLER, 1984).

Die Glukoneogeneserate aus Pyruvat betrug ohne Cd-Zusatz jeweils 2,2 und 1,7 nmol Glukose/mg Protein $\times$ min für Nierentubuluszellfragmente aus unbehandelten und Zn-vorbehandelten Ratten. Während in den Nierentubuluszellfragmenten von unbehandelten Ratten bei Inkubation mit 44 und 200 μM CdCl_2 die Glukoseproduktion in zunehmendem Maße gehemmt wurde, trat bei der Inkubation mit Cd-Thionein die Hemmung erst bei 200 μM Cd auf (Abb. 14A,B). In den Zellen aus Zn-vorbehandelten Ratten wurde die Glukoseproduktion durch 200 μM CdCl_2 gehemmt; die Inkubation mit Cd-Thionein zeigte dagegen bis 200 μM Cd keine Hemmung (Abb. 14C,D).

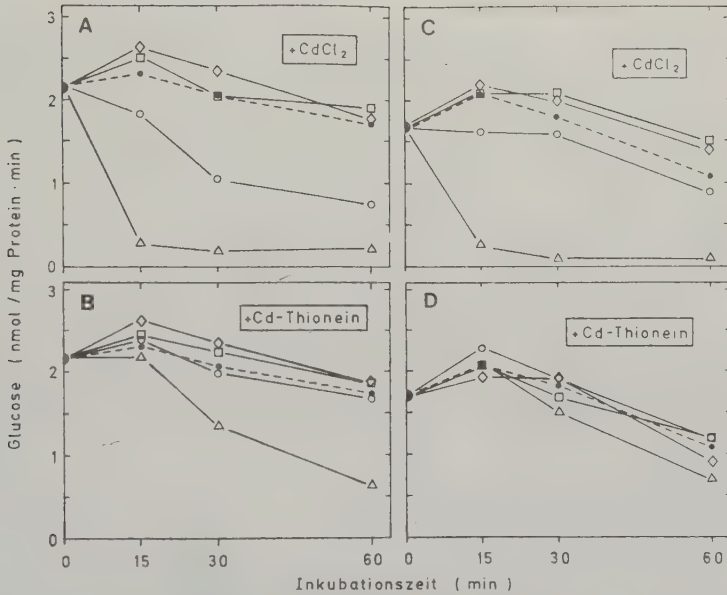


Abb. 14 Glukosebildung aus Pyruvat in Nierentubuluszellfragmenten von unbehandelten (A,B) und Zn-vorbehandelten (C,D) Ratten nach Inkubation mit CdCl₂ (A,C) und Cd-Thionein (B,D)

Die Nierentubuluszellfragmente wurden präpariert (MATERIAL UND METHODEN 8b) und anschließend in Krebs-Henseleit-Puffer bei 37°C in folgenden Endkonzentrationen inkubiert:

Protein: 11 mg/ml;

Kadmium: 0 (●, Kontrolle), 2 (□), 10 (◇), 44 (○), 200 (△) /μM.

Nach den angegebenen Zeiten wurde je ein Aliquot mit Pyruvat versetzt, für weitere 30 min inkubiert und die dabei gebildete Glukosemenge bestimmt (Einzelheiten siehe MATERIAL UND METHODEN 8d). Die angegebenen Werte repräsentieren den Mittelwert aus 3 Präparationen mit folgenden mittleren Standardabweichungen: A: $43 \pm 14\%$, B: $37 \pm 16\%$, C: $54 \pm 24\%$, D: $58 \pm 24\%$.

Demnach war die Hemmbarkeit der Glukoneogenese durch Cd in Nierentubuluszellfragmenten mit erhöhten Metallothioneingehalten geringer ausgeprägt als in Kontrollzellen. Das könnte auf eine intrazelluläre Schutzfunktion von Metallothionein vor Cd-vermittelter Toxizität hindeuten. Diese Vermutung steht in Einklang mit in vivo Daten, wonach eine Vorbehandlung der Tiere mit geringeren Cd-Dosen eine Verringerung der Toxizität nachfolgender höherer Cd-Dosen bewirkte (NORDBERG, 1971; LEBER und MIYA, 1976; PROBST et al., 1977; ROBERTS et al., 1976; YOSHIDA et al., 1976). Auch hierbei wurde spekuliert, daß der Schutzeffekt durch die Neusynthese von Metallothionein bewirkt wird. Einmal an Thionein gebundenes Cd scheint aufgrund der relativ hohen Stabilität von Cd-Thionein in einem biologisch inerten Zustand vorzuliegen. Die daraus resultierende geringere Toxizität von Cd-Thionein im Vergleich zu $CdCl_2$ konnte in den hier vorliegenden Versuchen bei beiden Zellarten gezeigt werden. Die Befunde stehen dabei in Einklang mit der geringeren Toxizität des Cd-Thioneinkomplexes in Mäusen (NORDBERG, 1971; PROBST et al., 1977), Nervenzellen (SUGAWARA et al., 1983), und einer geringeren Beeinträchtigung von isolierten Mikrosomen (WAKU et al., 1980; ROBERTS und SCHNELL, 1982) sowie verschiedenen Enzymaktivitäten (CHRISTIE und COSTA, 1984). Im Gegensatz hierzu wurde Cd-Thionein auch als die toxischere Form für die Niere (CHERIAN et al., 1976; WEBB und ETIENNE, 1977) und den Intestinaltrakt (VALBERG et al., 1977) beschrieben.

Diese kontroversen Befunde zur Toxizität von Cd in Abhängigkeit von der Bindungsform erfordern weitere Untersuchungen, um die Wirkung des Schwermetalles besser zu verstehen. Aufgrund der meist unklaren Pharmakokinetik sind in vivo Experimente hierzu schwer zu interpretieren. Untersuchungen an primären oder etablierten Zellsystemen sind übersichtlicher und können detaillierte Erkenntnisse zum Verständnis des molekularen Mechanismus der Cd-Toxizität liefern. Die in dieser Arbeit dargestellten Möglichkeiten zur Präparation von Zellen mit erhöhten Metallothioneingehalten sind dazu geeignet.

3. Metallothionein bei Säugetieren

3a. Organverteilung von Metallothionein in Ratten

Untersuchungen über Metallothionein in Säugetieren wurden hauptsächlich in der Leber, der Niere, dem Pankreas und dem Dünndarm durchgeführt. In anderen Organen ist über das Vorkommen von Metallothionein wenig bekannt. Da jedoch bei allen Fragestellungen über die Induktion dieses Proteins genaue Kenntnis über die basalen Gehalte vorliegen müssen, wurden die endogenen Metallothioneingehalte in verschiedenen Geweben von unbehandelten Ratten bestimmt.

In den elf untersuchten Organen und Geweben konnte Metallothionein nachgewiesen werden. Die Gehalte lagen zwischen 2 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht im Muskelgewebe und 50 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht in der Niere (Abb. 15).

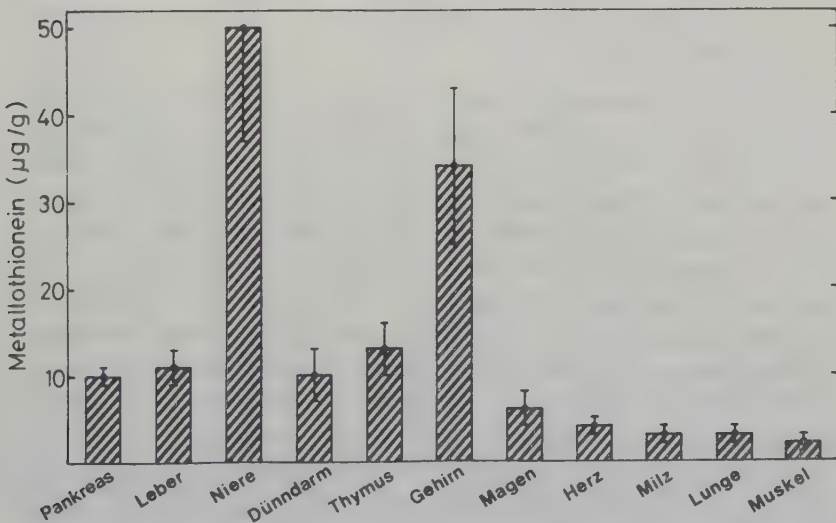


Abb. 15 Metallothioneingehalte in verschiedenen Geweben der Ratte

Die Metallothioneingehalte wurden im 18 000 g Überstand der Gewebs-homogenate von 200 g schweren Wistar Ratten mit dem Kadmium-Hämoglobin Bindungstest bestimmt (siehe MATERIAL UND METHODEN 5a,f).

3b. Metallothioneininduktion durch Zn und Jodessigsäure

Als die besten Induktoren von hepatischem Metallothionein stellten sich Metalle heraus, wobei sich Zn unter zwölf untersuchten Metallen am effektivsten erwies (EATON et al., 1980). Daneben wurden auch organische Chemikalien wie Tetrachlorkohlenstoff, Brombenzol und Jodessigsäure in ihrer Fähigkeit zur Induktion von hepatischem Metallothionein beschrieben (OH et al., 1978; KOTSONIS und KLAASSEN, 1979).

Da in biologischem Material die metallfreie Form des Proteins nicht vorzukommen scheint, wirft jede Metallothioneininduktion die Frage auf, wie der Metallbedarf für neu synthetisiertes Thionein gedeckt werden kann. Anders als bei der Gabe von Metallsalzlösungen muß bei der Metallothioneininduktion durch Chemikalien dieser Bedarf durch Umverteilung aus endogenen Quellen gesättigt werden. Zn ist in den meisten Fällen die hauptsächliche Metallkomponente von Metallothionein (KÄGI und NORDBERG, 1979). Bei den Versuchen zur Metallothioneininduktion durch Nichtmetallinduktoren wurde deshalb auch der Zn-Status in den Organen bestimmt.

Die Metallothioneingehalte wurden in elf Geweben der Ratte 18 h nach i.p. Injektion von physiologischer Kochsalzlösung, Jodessigsäure (15 und 30 mg/kg) oder Zinksulfat (20 mg Zn/kg) bestimmt. Sie variierten in der Kontrollgruppe zwischen 2 µg/ Frischgewicht für Muskelgewebe und 52 µg/g Frischgewicht für Leber. Die Metallothioneingehalte dieser Kontrollgruppe unterschieden sich in keinem Organ von den Werten, die bei den unbehandelten Ratten erhalten wurden (vergleiche ERGEBNISSE 3a). Stress, wie erhöhte Arbeitsleistung und Scheinoperationen, wurde als Induktor von Metallothionein erkannt (OH et al., 1978; BRADY, 1981). Die i.p. Injektion einer Kochsalzlösung scheint keinen Stress in diesem Sinne darzustellen. Behandlung mit Jodessigsäure bewirkte eine Zunahme der Metallothioneingehalte in Leber (x 23, x 26) und Pankreas (x 2, x 5) bei beiden Dosen, wogegen eine Zunahme in Muskel (x 3) und Thymus (x 2) nur bei der höheren Dosis verzeich-

Tab. 7 Metallothioneingehalte in verschiedenen Geweben von Wistar Ratten nach Injektion von Jodessigsäure oder Zinksulfat

Die Ratten wurden 18 h vor Entnahme der Gewebe mit den angegebenen Dosen i.p. injiziert und die Kontrollen erhielten 2 ml/kg einer physiologischen Kochsalzlösung. Die Metallothioneingehalte wurden im 18 000 g Überstand der Gewebshomogenate mit dem Kadmium-Hämoglobin Bindungstest bestimmt (siehe MATERIAL UND METHODEN 5f).

Gewebe	Metallothionein ($\mu\text{g/g}$)					
	Kontrolle	Jodessigsäure		Zinksulfat		
		(15 mg/kg)	(30 mg/kg)	(20 mg Zn/kg)		
Gehirn	38 $\pm$ 8	25 $\pm$ 3	28 $\pm$ 6	39 $\pm$ 3		
Herz	4 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2	6 $\pm$ 2	17* $\pm$ 1		
Niere	52 $\pm$ 8	38 $\pm$ 4	44 $\pm$ 12	253* $\pm$ 68		
Leber	9 $\pm$ 2	204* $\pm$ 12	232* $\pm$ 8	804* $\pm$ 113		
Lunge	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	4 $\pm$ 1	5* $\pm$ 1		
Muskel	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	6* $\pm$ 1	3 $\pm$ 1		
Pankreas	11 $\pm$ 1	19* $\pm$ 3	52* $\pm$ 13	1116* $\pm$ 251		
Dünndarm	13 $\pm$ 1	9 $\pm$ 3	16 $\pm$ 2	356* $\pm$ 62		
Milz	4 $\pm$ 1	3 $\pm$ 1	5 $\pm$ 2	12* $\pm$ 4		
Magen	7 $\pm$ 1	7 $\pm$ 3	9 $\pm$ 2	32* $\pm$ 7		
Thymus	16 $\pm$ 2	15 $\pm$ 2	27* $\pm$ 4	19 $\pm$ 2		

* Werte signifikant verschieden von der Kontrolle ($p < 0,01$).

net werden konnte. Die Injektion von Zinksulfat erhöhte die Gehalte am stärksten in Pankreas (x 101), Leber (x 89) und Dünndarm (x 27), daneben aber auch in Herz (x 4), Niere (x 5), Lunge (x 3), Milz (x 3) und Magen (x 5) (Tab. 7).

Die Gesamt-Zn-Gehalte von Leber, Niere, Dünndarm und Pankreas lagen in der Kontrollgruppe zwischen 21 und 29 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren in den Zn-vorbehandelten Ratten die Zn-Gehalte im Gesamtgewebe von Leber (x 3,5), Niere (x 2,0), Dünndarm

Tab. 8 Zn-Status in Leber, Niere, Dünndarm und Pankreas von Wistar Ratten 18 h nach i.p. Injektion von Jodessigsäure oder Zinksulfat

Die Gesamt-Zn-Gehalte in den Geweben wurden nach Naßveraschung der Proben bestimmt (siehe MATERIAL UND METHODEN 5b). Auf der Basis von 7 Mol Zn/Mol Metallothionein wurde der Thionein-gebundene Zn-Gehalt berechnet und durch Subtraktion der beiden Werte der nicht Thionein-gebundene Zn-Gehalt ermittelt.

Gewebe- kompartiment	Zn (/ug/g)							
	Kontrolle	Jodessigsäure		Zinksulfat (20 mg Zn/kg)				
		(15 mg/kg)	(30 mg/kg)					
LEBER								
Gesamt	29	$\pm$ 2	50*	$\pm$ 1	56*	$\pm$ 6	102*	$\pm$ 14
Thionein-gebunden	0,6	$\pm$ 0,2	14,2*	$\pm$ 0,9	15,8*	$\pm$ 1,2	55,8*	$\pm$ 7,8
Gesamt-(Thionein-g.)	28	$\pm$ 2	36*	$\pm$ 1	40*	$\pm$ 5	46*	$\pm$ 7
NIERE								
Gesamt	23	$\pm$ 2	28	$\pm$ 5	25	$\pm$ 1	46*	$\pm$ 6
Thionein-gebunden	3,6	$\pm$ 0,6	2,6	$\pm$ 0,2	3,1	$\pm$ 0,8	17,5*	$\pm$ 4,7
Gesamt-(Thionein-g.)	20	$\pm$ 3	25	$\pm$ 4	22	$\pm$ 2	28*	$\pm$ 4
DÜNNDARM								
Gesamt	21	$\pm$ 4	20	$\pm$ 2	22	$\pm$ 1	60*	$\pm$ 25
Thionein-gebunden	0,9	$\pm$ 0,5	0,6	$\pm$ 0,3	1,1	$\pm$ 0,1	24,7*	$\pm$ 4,3
Gesamt-(Thionein-g.)	20	$\pm$ 4	19	$\pm$ 1	21	$\pm$ 1	35*	$\pm$ 7
PANKREAS								
Gesamt	21	$\pm$ 1	29*	$\pm$ 2	30*	$\pm$ 5	215*	$\pm$ 85
Thionein-gebunden	0,7	$\pm$ 0,1	1,3*	$\pm$ 0,2	3,6*	$\pm$ 1,0	77,4*	$\pm$ 17,4
Gesamt-(Thionein-g.)	21	$\pm$ 1	27*	$\pm$ 2	26**	$\pm$ 4	132**	$\pm$ 82

* Werte signifikant verschieden von der Kontrolle: (p < 0,01)

** Werte signifikant verschieden von der Kontrolle: (p < 0,05)

(x 2,9) und Pankreas (x 10,2) jeweils signifikant erhöht. Behandlung mit Jodessigsäure ließ demgegenüber die Zn-Gehalte nur in Leber (x 1,7, x 1,9) und Pankreas (x 1,4, x 1,4) signifikant ansteigen. Der durch Subtraktion erhaltene, nicht an Thionein gebundene Zn-Anteil nahm in allen Geweben zu, in denen die Metallothioneingehalte und die Gesamt-Zn-Gehalte erhöht waren (Tab. 8).

Thionein band bei den unbehandelten Ratten in der Niere 15%, im Gehirn 13% und in den anderen Geweben weniger als 6% des vorhandenen Zn. Dieser Anteil stieg nach Zn-Behandlung der Tiere auf 35 bis 55% in Leber, Pankreas, Niere und Dünndarm an. Demgegenüber repräsentierte er im Gehirn dann 13% und in den anderen Geweben weniger als 5% des Gewebe-Zn (Abb. 16).

Die Ergebnisse zeigen, daß in Leber, Pankreas, Niere und Dünndarm die Metallothioneingehalte am stärksten erhöht werden konnten. Gleichzeitig ist in diesen vier Organen die Erhöhung der Zn-Gehalte am ausgeprägtesten.

Der Mechanismus der Metallothioneininduktion ist noch ungeklärt. Es wurde in diesem Zusammenhang vermutet, daß elektrophile Chemikalien Zn von verschiedenen körpereigenen Liganden freisetzen könnten (KOTSONIS und KLAASSEN, 1979) oder daß die Organe vermehrt Zn aufnehmen. Die erhöhten Zn-Gehalte würden dann zur Metallothioneininduktion führen, sobald eine Schwelle überschritten wird. Für die Rattenleber wurde diese Schwelle, die zur de novo Synthese führt, mit 30 µg/g Frischgewicht angegeben (WEBB und CAIN, 1982). Bei den vorgelegten Untersuchungen wurde diese Schwelle in der Leber nach Jodessigsäure- und Zn-Behandlung deutlich überschritten. Allerdings war nach Jodessigsäure-Behandlung im Pankreas ein Gesamt-Zn-Gehalt von 30 µg/g Frischgewicht nicht überschritten, obwohl Metallothioneininduktion zu verzeichnen war. Der für die Leber diskutierte Schwellenwert des Gewebe-Zn für das Einsetzen von Metallothionein-neusynthese scheint deshalb nicht auf andere Organe übertragbar zu sein. Nach Jodessigsäure- und Zn-Behandlung war eine Metallothioneinzunahme immer auch mit einer Erhöhung im Gewebe-Zn-Gehalt verbunden. Diese Zn-Zunahme überstieg in allen Fällen den Bedarf des neusynthetisierten Thioneinanteils für das Metall.

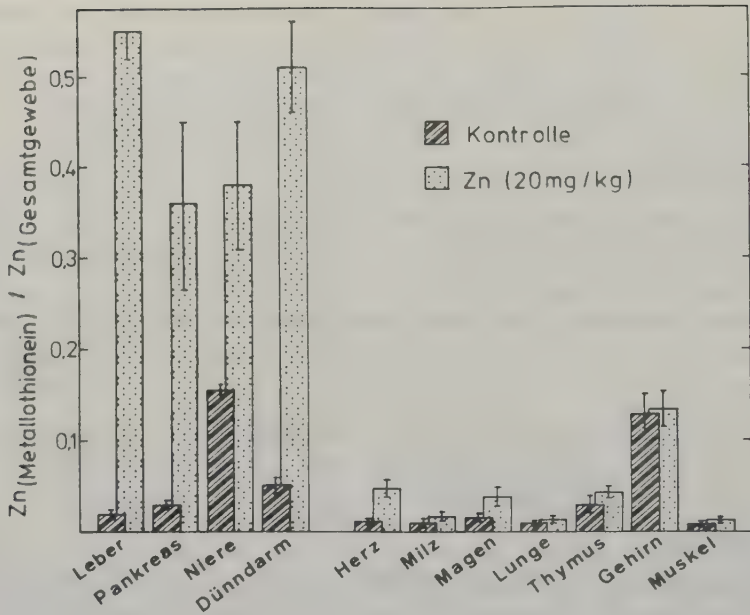


Abb. 16 Verhältnis des Thionein-gebundenen Zn-Anteils zum Gesamt-Zn-Gehalt in verschiedenen Geweben von Wistar Ratten 18 h nach i.p. Injektion von Zinksulfat (20 mg Zn/kg)

Die Metallothioneingehalte wurden im 18 000 g Überstand der Gewebshomogenate (siehe MATERIAL UND METHODEN 5a,f) und die Zn-Gehalte nach Naßveraschung (siehe MATERIAL UND METHODEN 5b) bestimmt. Auf der Basis von 7 Mol Zn/Mol Metallothionein wurde das angegebene Verhältnis errechnet.

Die Mechanismen, die den Zn-Gehalt in den Geweben regulieren, sind bisher wenig bekannt. Obwohl in den vorliegenden Untersuchungen die Parallelität zwischen Erhöhung des Gewebe-Zn und Metallothioneininduktion gezeigt werden konnte, bleibt die Frage unbeantwortet, ob die Zn-Akkumulation der Induktion vorausgeht, oder die Folge von ihr ist.

3c. Metallothioneininduktion durch Penicillamin

Penicillamin, ein in der D-Konfiguration vorliegendes allen Penicillinen gemeinsames Spaltprodukt, besitzt aufgrund der Aminothiol-Gruppierung chelierende Eigenschaften (Abb. 17). Es wird deshalb als Antidot bei Schwermetallvergiftungen eingesetzt (KREYSEL, 1977).

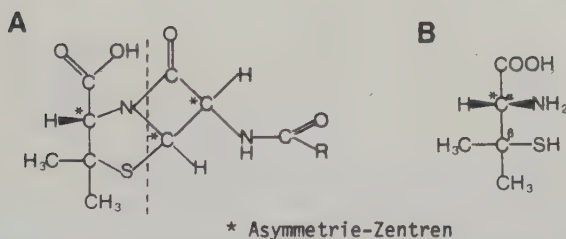


Abb. 17 Allgemeine Formel der Penicilline (A) und Strukturformel von D-(-)-Penicillamin (B)

Die Beeinflussung der Metallhomöostase durch Penicillamin betrifft auch die essentiellen Metalle Zn und Cu, die zur Neusynthese von Metallothionein befähigt sind (ALBERGONI *et al.*, 1975). Es war deshalb von Interesse, die Wirkung von Penicillamin auf die Metallothionein-, Zn- und Cu-Gehalte in Geweben mit hoher Synthesekapazität für Metallothionein zu untersuchen.

Penicillamin erwies sich als effektiver Induktor von Metallothionein. 18 h nach einmaliger Applikation verschiedener Dosen an Penicillamin konnte der stärkste Anstieg der Metallothioneingehalte in der Leber verzeichnet werden. Eine Dosis von 20 mg/kg bewirkte eine Verdoppelung und 200 mg/kg ließ den Metallothioneingehalt auf etwa das 15-fache des Kontrollwertes von $9 \pm 2 \mu\text{g}$ Frischgewicht ansteigen. Demgegenüber ergaben sich keine signifikanten Veränderungen in den Metallo-

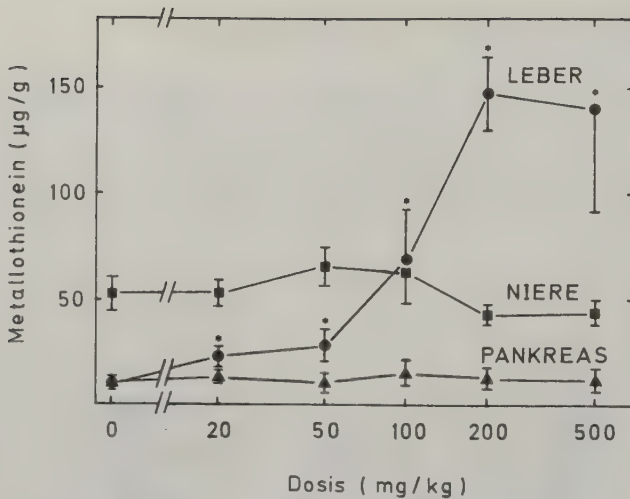


Abb. 18 Metallothioneingehalte in Leber, Niere und Pankreas von Wistar Ratten 18 h nach i.p. Injektion verschiedener Dosen Penicillamin

Die Metallothioneingehalte wurden im 100 000 g Überstand der Gewebs-homogenate mit dem Kadmium-Hämoglobin Bindungstest bestimmt (siehe MA-TERIAL UND METHODEN 5f).

* Werte signifikant verschieden von der Kontrolle ($p < 0,05$).

thioneinspiegeln von Niere und Pankreas (Abb. 18).

Bei einer Dosis von 200 mg Penicillamin/kg wurde der zeitliche Verlauf der hepatischen Metallothioneingehalte bestimmt. 4 h nach Injektion begann der Anstieg, der nach 18 h zum Maximalwert von 148 ± 18 µg/g Frischgewicht führte. Danach sank der Gehalt ab und erreichte 48 h nach Injektion mit $17,8 \pm 8,8$ fast wieder den Kontrollwert (Abb. 19). Dieser zeitliche Verlauf entspricht damit den Verhältnissen nach einmaliger Metallsalzapplikation, wobei WEINER und COUSINS (1980) und BRADY (1982) ebenfalls das Maximum der Metallothioneinspiegel nach 18 h fanden.

Durch Sephadex G-75-Chromatographie von Leberzytosol aus Penicillamin-behandelten Ratten konnte gezeigt werden, daß hauptsächlich Zn im

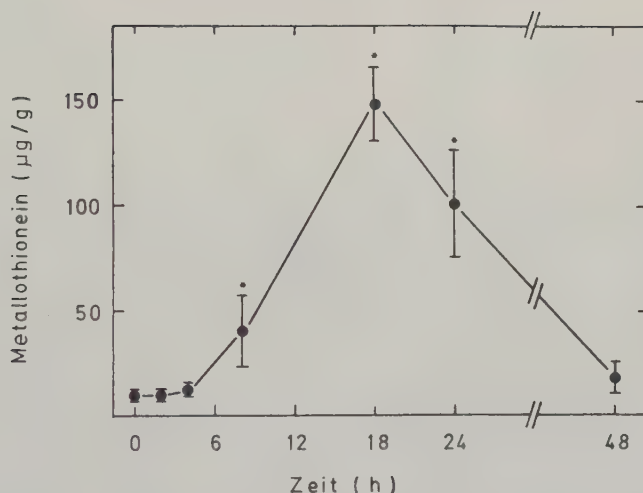


Abb. 19 Metallothioneingehalte in der Leber von Wistar Ratten verschiedene Zeiten nach i.p. Injektion von Penicillamin (200 mg/kg)

Die Metallothioneingehalte wurden im 100 000 g Überstand der Gewebs-homogenate mit dem Kadmium-Hämoglobin Bindungstest bestimmt (siehe MATERIAL UND METHODEN 5f).

* Werte signifikant verschieden von der Kontrolle ($p < 0,05$).

neu synthetisierten Metallothionein vorhanden war. Der Cu-Anteil betrug dabei weniger als 1% des Zn-Gehaltes. Der Anstieg von Zn im Metallothioneinbereich (Fraktionen 24-30) war dabei begleitet von einer Abnahme des Zn-Gehaltes der hochmolekularen Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 10 000 (Abb. 20).

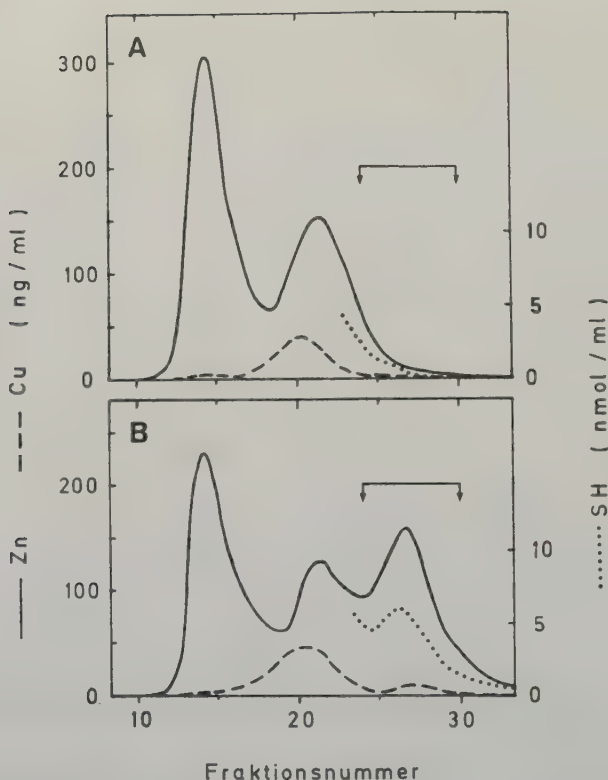


Abb. 20 Sephadex G-75 Elutionsprofile von Leberzytosol aus Kontroll-Ratten (A) und Penicillamin-vorbehandelten Ratten (B)

Wistar Ratten wurden jeweils 18 h vor Entnahme der Leber mit einer einmaligen Dosis physiologischer Kochsalzlösung (2 ml/kg) oder Penicillamin (200 mg/kg) behandelt. Aliquote des 100 000 g Überstandes von jeweils 3 gepoolten Lebern, entsprechend 0,35 g Leberfrischgewicht, wurden auf eine 1,6 x 84 cm Sephadex G-75 Säule aufgetragen. 4,5 ml Fraktionen wurden bei einer Flußgeschwindigkeit von 16 ml/h gesammelt. In den Fraktionen wurden die Zn- und Cu-Gehalte sowie im Molekulargewichtsbereich 10 000 die Thiolatgehalte (SH) bestimmt. Die Position von Metallothionein ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Tab. 9 Zn- und Cu-Gehalte in Leber, Niere und Pankreas von Wistar Ratten 18 h nach i.p. Injektion von Penicillamin

Die Metallgehalte in den Geweben wurden nach NaBVeraschung der Proben bestimmt (siehe MATERIAL UND METHODEN 5b).

Penicillamin- dosis (mg/kg)	Leber		Niere		Pankreas	
			Zn (μ g/g)			
0	27,9	$\pm 1,8$	24,0	$\pm 2,7$	21,3	$\pm 1,1$
200	35,4*	$\pm 5,6$	23,1	$\pm 3,9$	20,1	$\pm 3,3$

Penicillamin- dosis (mg/kg)	Leber		Niere		Pankreas	
			Cu (μ g/g)			
0	4,8	$\pm 0,8$	8,8	$\pm 1,1$	1,4	$\pm 0,2$
200	3,7	$\pm 0,7$	5,4*	$\pm 1,0$	0,8*	$\pm 0,2$

* Werte signifikant verschieden von der Kontrolle ($p < 0,05$)

In den Gewebehomogenaten der drei untersuchten Organe zeigte sich 18 h nach Penicillaminapplikation eine Erhöhung des Zn-Gehaltes in der Leber, die Gehalte in Niere und Pankreas blieben unverändert. Bei den Cu-Gehalten ergab sich eine Abnahme in Niere und Pankreas, jedoch nicht in der Leber (Tab. 9). Die beobachtete Zunahme des Leber-Zn-Gehaltes nach Penicillamingaben war mit 27% relativ gering, verglichen mit der Zunahme von 70-90% nach Jodessigsäurebehandlung (siehe ERGEBNISSE 3b).

Der Einbau von Zn in neu synthetisiertes Metallothionein bewirkte eine Mobilisierung und Umverteilung von Zn, gekennzeichnet durch eine Zn-Zunahme im hepatischen Zytosol und eine Zn-Abnahme in den hochmolekularen löslichen Proteinen (Tab. 10).

Die Ergebnisse zeigen, daß im Gegensatz zu den Verhältnissen nach Jodessigsäuregabe (ERGEBNISSE 3b) die Vermehrung des Gesamt-Zn-Gehaltes

Tab. 10 Zn-Gehalte in Zytosol, zytosolischen hochmolekularen Proteinen und Metallothionein aus Lebern von Wistar Ratten 18 h nach i.p. Injektion von Penicillamin

Das Zytosol wurde durch Zentrifugation bei 100 000 g erhalten. Zytosolische hochmolekulare Proteine ($V_e/V_0 = 1,0-1,8$) und Metallothionein ($V_e/V_0 = 1,8-2,3$) wurden über Sephadex G-75 getrennt.

Penicillamin- dosis (mg/kg)	Zytosol	hochmoleku- lare Proteine	Metallo- thionein
	Zn ($\mu\text{g/g}$)		
0	19,7 $\pm$ 1,1	17,5 $\pm$ 5,2	0,7 $\pm$ 0,1 ^a
200	26,3* $\pm$ 4,6	13,2 $\pm$ 2,7	11,3* $\pm$ 1,9

^a Mit dem Kadmium-Hämoglobin Bindungstest (siehe MATERIAL UND METHODEN 5f) bestimmt, auf der Basis von 7 Mol Zn/Mol Metallothionein.

* Werte signifikant verschieden von der Kontrolle ($p < 0,05$).

der Leber nach Penicillamininjektion nicht ausreicht, den Metallbedarf von neu synthetisiertem Thionein zu decken. Vielmehr tritt dabei zusätzlich eine intrazelluläre Zn-Umverteilung auf.

3d. Metallothioneininduktion durch Tetrachlorkohlenstoff

In den bisherigen Untersuchungen war die Induktion von Metallothionein mit einer Zunahme des Gesamt-Zn-Gehaltes in den Geweben verbunden, selbst wenn kein exogenes Zn zugeführt wurde (ERGEBNISSE 3b,c). Durch Tetrachlorkohlenstoff, der die hepatische Metallothioneinsynthese zu induzieren vermochte (OH et al., 1978; CAGEN und KLAASSEN, 1979) wird allerdings die Aufnahme dieses essentiellen Metalls in der Leber vermindert (SONG und BOROWSKY, 1984). Deshalb war es von Interesse, den Zn-Status in der Leber nach Metallothioneininduktion durch Tetrachlorkohlenstoff zu bestimmen. Darüberhinaus ist nicht bekannt, ob durch

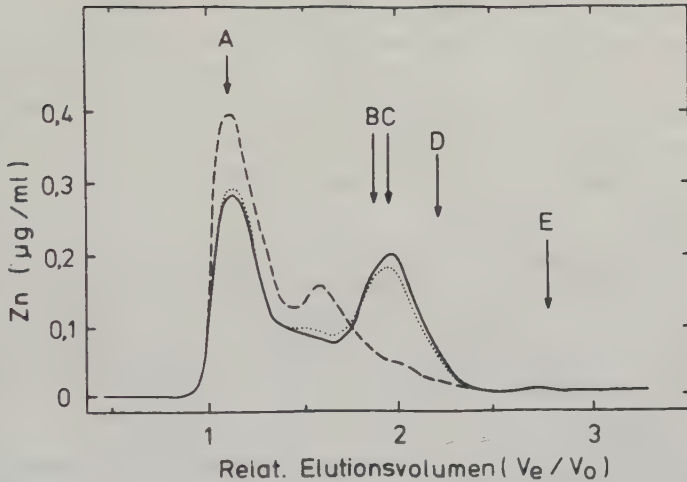


Abb. 21 Sephadex G-75 Elutionsprofile des Leberzytosols von NMRI Mäusen 18 h nach i.p. Injektion von Tetrachlorkohlenstoff

----- Kontrolle
..... 0,4 ml Tetrachlorkohlenstoff/kg
———— 2,0 ml Tetrachlorkohlenstoff/kg

Vereintes Lebercytosol von jeweils 4 Tieren entsprechend 0,4 g Leberfrischgewicht wurden auf eine 1,6 x 84 cm Sephadex G-75 Säule aufgetragen. Es wurden 5 ml Fraktionen bei einer Flußgeschwindigkeit von 18 ml/h abgenommen und die Zn-Konzentrationen bestimmt. Referenzverbindungen zur Säulenkalibrierung sind durch Pfeile gekennzeichnet:

A) Alkoholdehydrogenase aus Pferdeleber (M_r 83 000); B) Cytochrom C aus Pferdeherz (M_r 12 500); C) Zn-Thionein aus Rattenleber (M_r 10 000); D) Aprotinin aus Rinderlunge (M_r 6 000); E) Zn (Atomgewicht 65).

diese Metallothioneininduktion die Verteilung des nicht essentiellen Schwermetalls Cd in der Leber beeinflusst wird.

18 h nach Injektion von 0,4 oder 2 ml Tetrachlorkohlenstoff/kg konnte durch gelchromatographische Auftrennung des Zytosols eine Zunahme des Zn-Gehaltes im Metallothioneinbereich von $4,0 \pm 0,5$ (Kontrolle unbehandelt) auf $9,5 \pm 1,1$ (0,4 ml Tetrachlorkohlenstoff/kg) und $10,9 \pm 1,1$ $\mu\text{g Zn/g}$ Frischgewicht (2,0 ml Tetrachlorkohlenstoff/kg)

nachgewiesen werden*. Gleichzeitig konnte eine Abnahme der Zn-Gehalte in hochmolekularen Proteinen ($V_e/V_0 = 1,0-1,8$) verzeichnet werden (Abb. 21). Dabei änderte sich weder der Zn-Gehalt in der gesamten Leber noch im Zytosol, und so sind die neu an Thionein gebundenen Zn-Mengen (5,5 und 6,9 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht) nach Tetrachlorkohlenstoffbehandlung allein aus der Abnahme des Metalls in den hochmolekularen Proteinen (5,7 und 6,5 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht zu erklären (Tab. 11).

Diese Ergebnisse zeigen, daß im Falle der hepatischen Metallothionein-induktion durch Tetrachlorkohlenstoff die intrazytosolische Zn-Umverteilung allein ausreicht, den Metallbedarf des neu synthetisierten Thioneins zu decken. Ob dabei die beobachtete Zn-Freisetzung aus hochmolekularen Komponenten die Ursache oder die Folge der Neusynthese war, ist ungeklärt.

Gab man den Tieren 16 h nach Applikation von Tetrachlorkohlenstoff eine einmalige Injektion von CdCl_2 (4 $\mu\text{g Cd/kg}$) und untersuchte nach weiteren 2 h die hepatische Cd-Verteilung, so zeigten sich im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit CdCl_2 behandelt wurde, keine signifikanten Veränderungen in den Cd-Gehalten der gesamten Leber und des Zytosols. Demgegenüber wurde die Cd-Verteilung im Zytosol von der Tetrachlorkohlenstoffbehandlung beeinflusst (Tab. 12). Die an Metallothionein gebundene Cd-Menge erhöhte sich von $12,5 \pm 1,4$ $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht in der Kontrollgruppe auf $18,0 \pm 3,8$ und $23,1 \pm 6,4$ $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht in den Tetrachlorkohlenstoff-behandelten Gruppen. Gleichzeitig wurde in den mit Tetrachlorkohlenstoff behandelten Gruppen weniger Cd durch hochmolekulare Proteine gebunden ($7,2 \pm 1,6$ und $3,7 \pm 2,6$ gegenüber $10,7 \pm 1,7$ $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht in der Kontrollgruppe).

* Ein Teil des in dem Bereich mit einem relativen Elutionsvolumen $V_e/V_0 = 1,8-2,3$ gefundenen Zn wird durch Proteine mit einem relativen Molekulargewicht größer als 10 000 eingeschleppt.

Tab. 11 Zn-Gehalte in der Leber und in hepatischen subzellulären Fraktionen von NMRI Mäusen 18 h nach i.p. Injektion von Tetrachlorkohlenstoff

Das Zytosol wurde durch Zentrifugation bei 100 000g erhalten. Zytosolische hochmolekulare Proteine ($V_e/V_0 = 1,0-1,8$) und Metallothionein ($V_e/V_0 = 1,8-2,3$) wurden auf einer Sephadex G-75 Säule separiert, wie in der Legende zu Abb. 21 beschrieben.

Tetrachlor- kohlenstoff- dosis (ml/kg)	Gesamte Leber	Zytosol	hochmoleku- lare Proteine	Metallo- thionein
		Zn (µg/g)		
0	38,4 ± 1,1	31,2 ± 0,3	25,5 ± 0,6	4,0 ± 0,5
0,4	38,9 ± 3,7	30,9 ± 1,5	19,8*± 0,4	9,5*± 1,1
2,0	37,5 ± 3,3	30,7 ± 1,8	19,0*± 1,7	10,9*± 1,1

* Werte signifikant verschieden von der Kontrolle ($p < 0,05$).

Tab. 12 Cd-Gehalte in der Leber und in hepatischen subzellulären Fraktionen von NMRI Mäusen nach i.p. Injektion von Tetrachlorkohlenstoff und CdCl₂

Die Tiere erhielten 16 h nach i.p. Injektion von Tetrachlorkohlenstoff (0,4 und 2 ml/kg) eine einmalige i.p. Injektion von CdCl₂ (4 mg Cd/kg). 2 h später wurden die Lebern entnommen und die Cd-Gehalte bestimmt (vergleiche hierzu Tab. 11 und Abb. 21).

Tetrachlor- kohlenstoff- dosis (ml/kg)	Gesamte Leber	Zytosol	hochmoleku- lare Proteine	Metallo- thionein
		Cd (µg/g)		
0	31,8 ± 2,4	23,6 ± 3,0	10,0 ± 1,7	12,5 ± 1,4
0,4	34,5 ± 4,2	26,7 ± 3,7	7,2*± 1,6	18,0*± 3,8
2,0	32,6 ± 4,6	30,3 ± 6,9	3,7*± 2,6	23,1*± 6,4

* Werte signifikant verschieden von der Kontrolle ($p < 0,05$).

Somit scheint zumindest nach Tetrachlorkohlenstoffbehandlung ein erhöhter hepatischer Metallothioneingehalt die intrazelluläre Verteilung von Cd zu beeinflussen, ohne daß dabei deutliche Unterschiede im Metallgehalt des gesamten Gewebes sichtbar wären. Die Beeinflussung der Cd-Verteilung durch Veränderungen der Metallothioneinspiegel kann unter Umständen auch beim Menschen Bedeutung für die intrazelluläre Cd-Speicherung haben, wenn durch Stress oder Hormone das Protein induziert wird (OH et al., 1978; KLAASSEN, 1981).

4. Metallothionein in menschlichem Probenmaterial

Relativ wenige Veröffentlichungen befassen sich mit Metallothionein in menschlichen Geweben. Es ist die Isolation von Metallothionein aus menschlicher Leber und Niere (BÜHLER und KÄGI, 1974; PULIDO *et al.*, 1966) und die Bestimmung der Aminosäuresequenz der Isoformen (KISSLING und KÄGI, 1979) beschrieben, doch fehlen für den Menschen Angaben über Gewebskonzentrationen des Proteins. Zwei Organe stehen hierbei im Mittelpunkt des Interesses. Die Leber wegen ihrer ausgeprägten Fähigkeit zur Neusynthese von Metallothionein bei Labortieren und die Niere, weil Cd, ein Metall mit hoher Affinität zu Metallothionein, hauptsächlich in diesem Organ gespeichert wird.

4a. Metallothionein in Leberbiopsien

Da von den menschlichen Leberbiopsien nur wenig Material zur Verfügung stand (4-10 mg Frischgewicht), wurde zur Bestimmung der Metallothioneingehalte der ausreichend empfindliche Kadmium-Hämoglobin Bindungstest verwendet.

Die hepatischen Metallothioneingehalte variierten bei den 13 untersuchten Individuen zwischen 14,5 und 78,3 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht, beziehungsweise 0,13 und 0,73 $\mu\text{g/mg}$ Protein. Die drei höchsten Gehalte bezogen auf das Frischgewicht zeigten sich mit 70 $\mu\text{g/g}$ bei einem 43-jährigen Patienten mit cerebralen Anfällen nach Alkoholabusus, mit 76,8 $\mu\text{g/g}$ bei einer 25-jährigen Patientin, die nach einer Schwangerschaftscholestase mit Zn behandelt wurde, und mit 78,3 $\mu\text{g/g}$ bei einem 69-jährigen Patienten mit Bronchialkarzinom (Tab. 13).

Der Durchschnitt dieser Metallothioneingehalte der menschlichen Leber lag mit $49,6 \pm 21,6$ $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht etwa 5mal so hoch wie die Gehalte in der Leber von unbehandelten (11 ± 2 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht) und mit physiologischer Kochsalzlösung injizierten (9 ± 2 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht) Wistar Ratten (siehe ERGEBNISSE 3a,b).

Tab. 13 Metallothioneingehalte in menschlichen Leberbiopsien und Angaben zum Krankheitsbild der Patienten

Die Metallothioneingehalte wurden mit dem Kadmium-Hämoglobin Bindungstest bestimmt, wie unter MATERIAL UND METHODEN 5f angegeben.

Biopsie-Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Krankheitsbild	Metallothionein	
				(/ug/g Frischgew.)	(/ug/mg Protein)
333	w	52	unklarer Befund	34,8	n.b. ^a
358	m	57	Verdacht auf Fettleber	18,8	0,21
343	w	47	Verdacht auf Fettleber	58,7	0,42
362	w	35	Fettleber	14,5	0,13
226	m	51	Fettleber	43,1	0,38
227	m	67	Fettleber, Cholangitis	68,9	0,73
223	w	53	Verdacht auf Non-A/Non-B-Hepatitis	37,2	0,37
341	w	43	Verdacht auf Non-A/Non-B-Hepatitis	40,2	0,34
330	w	52	Chronisch persistierende Hepatitis	67,0	0,45
344	m	38	Verdacht auf Morbus Hodgkin	36,0	0,34
329	m	43	vergr. Leber, cerebrale Anfälle bei Alkoholabusus	70,0	n.b. ^a
340	w	25	Zn nach Schwangerschaftscholestase (2x) vor 8 Monaten	76,8	0,62
331	m	69	Bronchialkarzinom	78,3	0,55

^a nicht bestimmt

Da beim Bronchialkarzinom ein Zn-Einstrom in die Leber beschrieben wurde (VAN RIG und PORIES, 1981), könnte in diesem Fall und bei der Zn-Verabreichung nach Schwangerschaftscholestase die zu erwartende hepatische Zn-Akkumulation eine Erhöhung der Metallothioneinspiegel bewirkt haben. Vielleicht steht auch der übermäßige Konsum des bisher nur für die Mäuseleber nachgewiesenen Metallothioneininduktors Alkohol (WAALKES et al., 1984) in Zusammenhang mit dem relativ hohen hepatischen Metallothioneingehalt bei einem Patienten. Um aber in diesem und in anderen Fällen das Ausmaß einer Metallothioneinerhöhung angeben zu können, bedarf es der Kenntnis der normalen Metallothioneingehalte in der menschlichen Leber. Die in dieser Arbeit untersuchten Patienten können nicht als "Kontrollgruppe" dienen. Nachdem aber gesunde Personen in der Regel nicht biopsiert werden, können diese Kontrollwerte vermutlich nur aus konservierten Lebern von Organspendern erhalten werden.

4b. Beteiligung von Metallothionein an der Cd-Speicherung in der Nierenrinde

Mit dem Anstieg der weltweiten Cd-Emission in die Atmosphäre um den Faktor 4,3 (NPIAGU, 1979) und dem Anstieg der Cd-Gehalte in den Böden der EG um den Faktor 2,5-4 (UBA, 1981) seit der Jahrhundertwende nahm auch die Cd-Belastung des Menschen zu. Dabei erscheint die Cd-Zunahme in der menschlichen Niere noch drastischer und erreicht den Faktor 47 seit der Jahrhundertwende, während die Cd-Gehalte der Leber keinen Anstieg in dem Zeitraum ergaben (DRASCH, 1983; ELINDER und KJELLSTROM, 1977). Nachdem die Cd-Gehalte in der Nierenrinde etwa 50% höher als in der Niere sind und die höchsten Cd-Werte bei etwa 50-jährigen beobachtet wurden (ELINDER et al., 1976), wurden für die hier vorliegende Untersuchung Nierenrindenproben von 40 - 60-jährigen Personen verwendet.

Wesentliche Quellen der Cd-Aufnahme des Menschen sind die Nahrung und das Rauchen (HUTTON, 1983; FRIBERG et al., 1974; LEWIS et al., 1972a, b). Die heute durchschnittlich täglich konsumierten Nahrungsmittel

(USA) enthalten 75-100 μg Cd und 20 Zigaretten etwa 40 μg Cd, entsprechend 2-4 μg im Hauptstromrauch. Bei einer Cd-Resorption von etwa 4% über den Gastrointestinaltrakt und von 47-95% über die Lunge (ELLIS et al., 1979), kann bei starken Rauchern die Zigarette zur überwiegenden Aufnahmequelle für Cd werden (SHARMA et al., 1983). Deshalb sollten bei den Untersuchungen zur Cd-Speicherung in der menschlichen Nierenrinde die Rauchgewohnheiten der Personen berücksichtigt werden.

Da genügend Material zur Verfügung stand, wurde zur Metallothioneinbestimmung die gelchromatographische Methode (siehe MATERIAL UND METHODEN 5d) verwendet. Dadurch konnte zwischen den Thionein-gebundenen Metallen Cd, Zn und Cu unterschieden werden.

Die Elutionsprofile des Nierenrindenzytosols eines 42-jährigen starken Rauchers (Gesamt-Cd-Gehalt 53,7 $\mu\text{g/g}$ Nierenrinde) zeigten, daß vorhandenes Metallothionein Cd, Zn und Cu enthielt, wobei Cd mit 90% (Gewichts-%) die hauptsächliche Metallkomponente war. Der Thionein-gebundene Metallanteil stellte für Cd, Zn und Cu 64, 14 und 29% des jeweiligen gesamten Metallgehaltes im Zytoplasma dar. Nach Erhitzen der Fraktionen auf 100°C war keine der untersuchten Meßgrößen im Bereich des Metallothionein-Maximums (Fraktionen 27-29) deutlich verändert. Vielmehr erhöhte der Erhitzungsschritt die Auflösung der Trennung, indem hitzelabile Proteinverunreinigungen in den Fraktionen 21-26 entfernt wurden (Abb. 22).

Bei der Auftragung der Thionein-gebundenen Cd-Anteile aller 47 vermessenen Nierenrindenproben (1-66 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht) gegen den jeweiligen Gesamt-Cd-Gehalt (5-99 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht) ergab sich eine gute Korrelation mit $r = 0,932$ (Abb. 23). Die Zn-Gehalte in den Metallothionein-Fractionen des untersuchten Probenmaterials lagen zwischen 0,2 und 4 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht. Dabei ergab sich kein Hinweis auf erhöhte Thionein-gebundene Zn-Anteile bei vermehrter Metallothionein-Akkumulation. Dem steht die Beobachtung bei tierexperimentellen Studien an Ratten und Mäusen gegenüber, daß akute Cd-Exposition die Bildung einer Mischform von (Cd, Zn)-Thionein bewirkt, und damit neben dem applizierten Cd auch Zn aus endogenen Bindungsformen umverteilt und in Me-

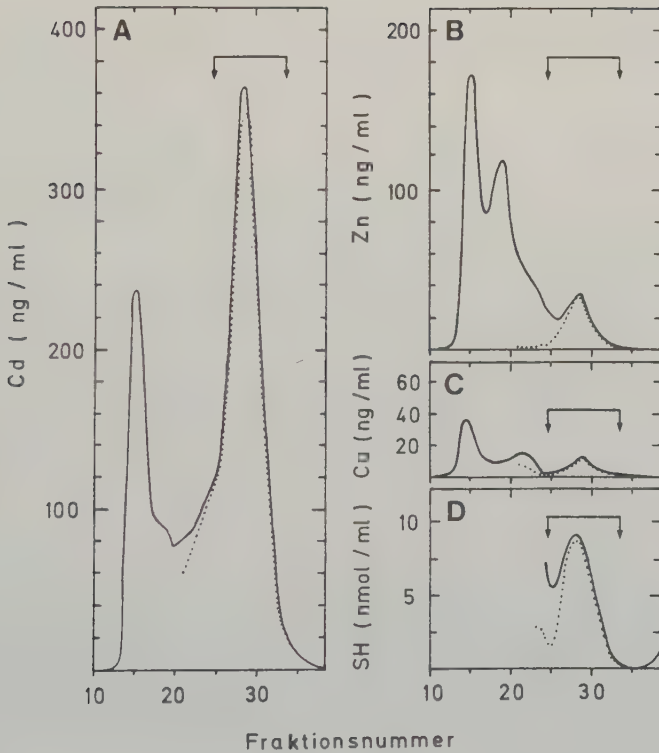


Abb. 22 Sephadex G-75 Elutionsprofile des Zytosols einer Nierenrin-
denprobe eines Rauchers

Ein Aliquot des 100 000 g Überstandes eines 20%igen Nierenrindenhomo-
genates, entsprechend 0,2 g Frischgewicht wurde auf eine 1,6 x 84 cm
Sephadex G-75 Säule aufgetragen. 4,1 ml Fraktionen wurden bei einer
Flußgeschwindigkeit von 15 ml/h gesammelt und in den Fraktionen die
Cd-(A), Zn-(B), Cu-(C) und Thiolatgehalte (SH, D) bestimmt (—).

Je ein Teil der Fraktionen 21 - 38 wurde zusätzlich in einem Eppendorf
Reaktionsgefäß zweimalig für 3 min auf 100°C erhitzt. Nach Abzentrif-
ugieren der hitzelabilen Anteile wurden erneut die Cd-, Zn-, Cu- und
Thiolatgehalte bestimmt (.....).

Die Position von Cd-Thionein und Zn-Thionein der Rattenleber aus Re-
ferenzläufen ist durch Pfeile gekennzeichnet.

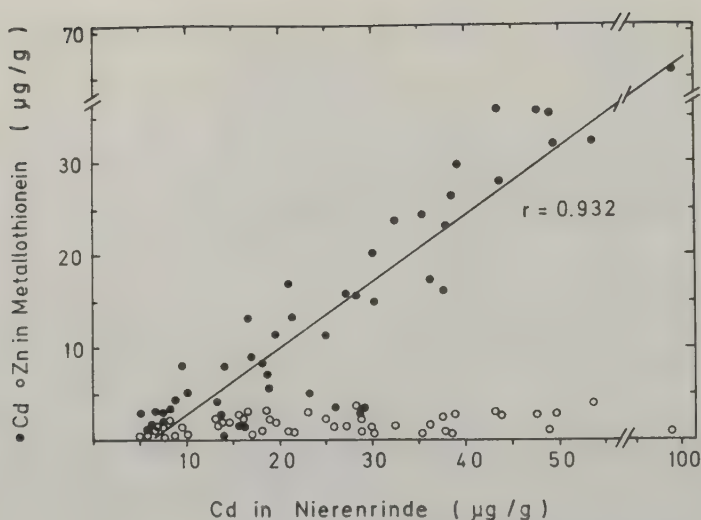


Abb. 23 Abhängigkeit der Thionein-gebundenen Cd- und Zn-Gehalte von den Gesamt-Cd-Gehalten in menschlichen Nierenrindenproben

Die Gesamt-Cd-Gehalte in den Nierenproben wurden nach Naßveraschung in einer Endverdünnung von 1:50 bestimmt (siehe MATERIAL UND METHODEN 5b). Bei einigen Proben war eine zusätzliche 1:5 Verdünnung nötig. Thionein-gebundene Cd- und Zn-Gehalte wurden nach Separation des hitzestabilen Zytosolanteils auf einer 0,9 x 13,5 cm Sephadex G-75 Säule (Flußgeschwindigkeit 6 ml/h, 0,4 ml Fraktionen) in den vereinten, Metallothionein enthaltenden Fraktionen bestimmt.

tallothionein eingelagert wird (SATO und NAGAI, 1980; YOSHIKAWA und OHTA, 1982; SUZUKI, 1984).

Cu stellt die Metallkomponente dar, die bei den hier vermessenen Proben in geringster Menge im Metallothionein vorhanden war. Der durchschnittliche Cu-Gehalt in den Metallothionein-Fraktionen betrug mit 1,1 µg/g Frischgewicht etwa zwei Drittel des durchschnittlichen Zn-Gehaltes von 1,7 µg/g Frischgewicht. Analog der beim Zn gemachten Beobachtung konnte auch für Cu keine Zunahme in Metallothionein bei erhöhter Metallothionein-Menge verzeichnet werden. Aus der Summe

der Zn-, Cu- und Cd-Gehalte in Metallothionein errechneten sich Metallothioneinwerte in dem Probenkollektiv von 16-599 mit einem Durchschnittswert von 154 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht.

Um den Einfluß des Rauchens auf die Cd-Gehalte und die Cd-Bindung an Metallothionein in der menschlichen Nierenrinde zu ermitteln, wurde das zur Verfügung stehende Kollektiv in drei Gruppen zu 14; 9 und 21 Personen als Nichtraucher, Raucher (weniger als 20 Zigaretten/Tag) und starke Raucher (mehr als 20 Zigaretten/Tag) unterteilt. Von drei Personen konnten die Rauchgewohnheiten nicht ermittelt werden. Wegen der starken Abweichung von der Gauß'schen Normalverteilung bei den Nichtrauchern, wurden die Mediane in den Gruppen als geometrische Mittel der linearisierten Messwerte angegeben. Diese Werte lagen für Thionein-gebundenes Cd in den Nichtrauchern, Rauchern und starken Rauchern bei jeweils 3,5; 8,1 und 16,1 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht und für das Cd des Gesamtgewebes bei 14,8; 14,2 und 28,9 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht. Damit war bei starken Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern der Cd-Gehalt doppelt so hoch, der Thionein-gebundene Cd-Anteil war sogar 5-fach erhöht. Weder beim Thionein-gebundenen Cd noch beim Cd des Gesamtgewebes konnten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen der Raucher und Nichtraucher beobachtet werden. Ausschlaggebend hierfür dürften 2 Personen in der Nichtraucher-Gruppe mit sehr hohen Cd-Werten sein (Abb. 24).

Mit einem durchschnittlichen Cd-Gehalt von 25,7 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht (arithmetisches Mittel) zeigte das hier untersuchte Kollektiv der zwischen 1981 und 1983 im Raum München Verstorbenen eine ähnliche Cd-Belastung wie Personen einer Studie in Boston, USA, mit 26,2 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht (LEWIS et al., 1972b) und Studien in Schweden mit einem Mittel von 22 und 25 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht (ELINDER et al., 1976; PISCATOR und LIND, 1972). Dabei scheint der Zigarettenkonsum eines starken Rauchers als größter Einzelbeitrag zur Speicherung von Cd in der Nierenrinde beizutragen. Erstmals wurde in dieser Arbeit der Thionein-gebundene Cd-Anteil der menschlichen Nierenrinde bestimmt, wobei der Einfluß der Rauchgewohnheiten deutlicher sichtbar wurde als bei dem Gesamt-Cd-Gehalt. Unter Umständen ist deshalb diese Proteinbin-

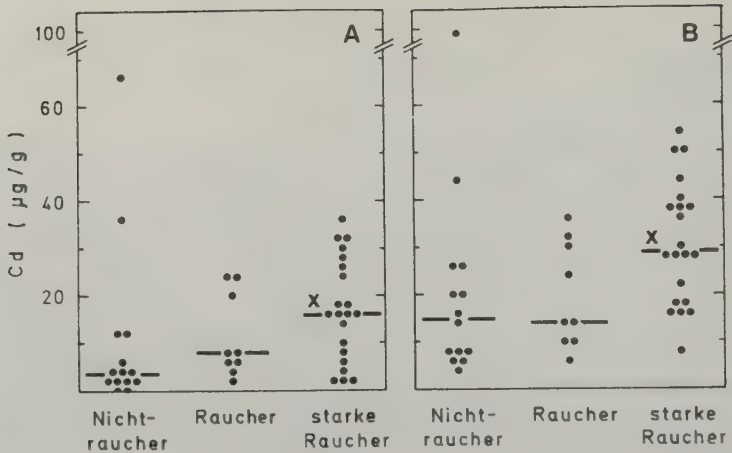


Abb. 24 Cd-Gehalte in Metallothionein (A) und Gesamt-Cd-Gehalte (B) in menschlichen Nierenrindenproben von Nichtrauchern, Rauchern und starken Rauchern

Das Kollektiv wurde entsprechend den Rauchgewohnheiten in 3 Gruppen zu 14, 9 und 21 Personen als Nichtraucher, Raucher (1-20 Zigaretten/Tag) und starke Raucher (mehr als 20 Zigaretten/Tag) unterteilt. Durchführung der Cd-Bestimmungen siehe Legende zu Abb. 23. Horizontale Balken kennzeichnen das geometrische Mittel der jeweiligen Gruppe, und Werte mit (x) sind signifikant verschieden von der Nichtrauchergruppe ($p < 0,05$).

dungsform ein sensiblerer Parameter als der Gesamt-Cd-Gehalt, um Veränderungen der Speicherung von Cd beim Menschen zu erfassen. Dabei ist noch ungeklärt, inwieweit die Toxizität von Cd durch die Induktion von Metallothionein beeinflusst wird.

DISKUSSION

Die meisten tierexperimentellen Untersuchungen über Metallothionein wurden nach Vorbehandlung der Tiere durchgeführt, wobei sich Metalle wie Zn, Cd und Cu als beste Induktoren des Proteins herausgestellt haben (KÄGI und NORDBERG, 1979). Dabei wurde mit den Angaben der "x-fachen Induktion" häufig für Verwirrung gesorgt, weil diese Größe entscheidend von den basalen Gehalten abhängt. Die am häufigsten gebrauchte analytische Methode der Metallothioneindetektion nach Sephadex G-75 Separation ist jedoch relativ unempfindlich. Neben der Empfindlichkeitsminderung durch den bis zehnfachen Verdünnungseffekt der Chromatographie ist hierfür eine unvollständige Trennung von Metallothionein und höhermolekularen Proteinen verantwortlich. Bei niedrigen Metallothioneingehalten täuschen deshalb Fremdproteine im Molekulargewichtsbereich 10 000 zu hohe Gehalte des Proteins vor. In Geweben mit erhöhten Metallothioneingehalten beläuft sich diese Überlagerung auf wenige Prozent und fällt damit nicht mehr so stark ins Gewicht (Abb. 1). Obwohl sich durch Erhitzen des Materials die Anwesenheit von Fremdproteinen im Metallothioneinbereich verringern ließ (Abb. 22), reichte die dann erzielte Meßempfindlichkeit von etwa 20 µg/g Frischgewicht immer noch nicht aus, die basalen Gehalte des Proteins in den meisten Geweben mit der Sephadex G-75 Methode zu bestimmen. Demgegenüber erwies sich der Kadmium-Hämoglobin Bindungstest mit einer Nachweisgrenze von 2 µg/g Frischgewicht als ausreichend empfindlich, die Gehalte von Metallothionein in elf bisher untersuchten Geweben von Säugetieren zu erfassen (ERGEBNISSE 3a,b,c).

Ein Radioimmunoassay für Metallothionein (VANDER MALLIE und GAPVEY, 1979; CHANG et al. 1980a) weist im Vergleich zum Kadmium-Hämoglobin Bindungstest eine um drei Zehnerpotenzen größere Empfindlichkeit auf, doch scheint diese in den meisten Geweben nicht benötigt zu werden. Im

Urin und Blut ist man allerdings wegen der geringen Metallothioneingehalte auf diesen immunologischen Test angewiesen (CHANG et al. 1980b). Die Autoren wiesen jedoch darauf hin, daß Cd-Thionein und Zn-Thionein in diesem Test komplette Kreuzreaktivität zeigen. Nachdem die physiologische Funktion von Metallothionein von den gebundenen Metallen abhängen dürfte, könnte dieser Mangel an Unterscheidungsmöglichkeit in dem Immuntest nachteilig sein. Der Kadmium-Hämoglobin Bindungstest bietet die Möglichkeit zwischen Thioneingebundenem Zn und Cd zu unterscheiden, wenn ohne vorhergehende Cd-Sättigung von Metallothionein Zn und Cd in dem Protein bestimmt wird. Bei Anwesenheit von Cu wird dieser Test jedoch wegen der hohen Bindungsaffinität dieses Metalls zum Thionein gestört (BRADY, 1982). Allerdings macht Cu, außer in Patienten mit Cu-Stoffwechselstörungen und Cu-belasteten Tieren weniger als 10% der Thionein-gebundenen Metalle aus (KÄGI und NORDBERG, 1979).

Die Notwendigkeit zur Bestimmung von Metallothionein ergibt sich aus der zunehmenden Erkenntnis, daß eine Vielzahl an Krankheiten mit einer Störung des Metallhaushaltes einhergeht (SIGEL, 1981) und deshalb Untersuchungen über Metallgehalte und Metallbindungsformen diagnostischen Wert haben können. Der Kadmium-Hämoglobin Bindungstest stellt einen Test für Zn- und Cd-Thionein dar, der infolge seiner raschen Durchführbarkeit Eingang in die klinische Praxis finden könnte. Er wird allerdings durch einen Radioimmunoassay für Messungen der Urin- und Plasmaspiegel von Metallothionein ergänzt werden müssen.

Die Metallothioneinspiegel ließen sich durch entsprechende Maßnahmen in vivo sowie auch in vitro erhöhen. So konnte in permanenten Zelllinien Metallothioneininduktion unter konstanter Inkubation mit einem induzierenden Agens ausgelöst werden. Im Falle der langfristigen Behandlung von Zellkulturen mit steigenden Dosen von Cd und Zn konnten Cd- und Zn-resistente Stämme mit erhöhten Metallothioneingehalten selektiert werden (GICK et al., 1981; GICK und McCARTHY, 1983). Das in dieser Arbeit erwähnte Gewöhen der H4IIEC3/G⁻ Zelllinie an eine sonst toxische Dosis von 20 µM Cd induzierte zwar Metallothionein, bewirkte allerdings keine fixierte Veränderung, die zu dem erhöhten Metallothioneingehalt führte (Tab. 5). Vermutlich ist deshalb für die

Entwicklung von Cd-Pesistenz mehr die Fähigkeit zur momentanen Neusynthese von Metallothionein ausschlaggebend, als genetisch determinierte hohe Spiegel des Proteins. Diese Hypothese wird auch durch die Beobachtung gestützt, daß der Metallothioneingehalt in einer menschlichen Epithelzelllinie nach Entfernen von Cd schneller absank als die Cd-Pesistenz (ENDPESEN et al., 1983). Allerdings zeigen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse, daß man Schutz vor der Zytotoxizität des Cd nicht allein durch Induktion von Metallothionein erklären kann. Der zellulären Cd-Aufnahme und vor allem der Cd-Bindung an hochmolekulare Proteine dürfte in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle zukommen. Dabei scheint endogenes Metallothionein nicht oder nur in geringem Ausmaß die zelluläre Cd-Aufnahme zu regulieren. Entscheidender für die zelluläre Cd-Aufnahme in vitro ist die Bindungsform des Metalls im extrazellulären Medium (ERGEBNISSE 2b). Damit übereinstimmend konnte in vivo auch gezeigt werden, daß endogenes Metallothionein nicht an der Kontrolle intestinaler Cd-Absorption beteiligt ist (FOULKES, 1982).

Die Übertragung von Ergebnissen aus in vitro Versuchen auf die in vivo Situation ist schwierig, weil sich permanente Zelllinien in der Enzymausstattung und -aktivität oft von den Zellen im Gewebeverband unterscheiden. Die Präparation von frisch isolierten Zellsystemen vermindert diesen Nachteil, wenngleich sie ihn auch nicht beseitigt (SCHWARZ und GREIM, 1980). Die Empfindlichkeit der Zellen erlaubt in einigen Fällen jedoch keine Kultivierung über 18 h oder länger, wie es für maximale Metallothioneininduktion mindestens nötig wäre. Will man deshalb frisch isolierte Zellsysteme mit erhöhten Metallothioneingehalten verwenden, so dürfte die dargestellte Kombination der in vivo-Induktion mit den in vitro-Techniken der Zellisolation ein wertvolles Hilfsmittel darstellen (ERGEBNISSE 2b). Dabei kann sich diese Technik außer auf Leber und Niere auch auf andere Organe ausdehnen lassen. Am interessantesten erscheint dies für Pankreas, Magen, Darm, Milz und Herz zu sein, in denen in vivo die höchsten Anstiege der endogenen Metallothioneinspiegel beobachtet werden konnten (Tab. 7).

In der vorliegenden Arbeit wurden 4 Substanzen auf ihre Fähigkeit zur Induktion von Metallothionein und auf ihre Beeinflussung der endogenen Metallspiegel in Labortieren untersucht, wobei das Schwergewicht auf Nichtmetallinduktoren lag. Insgesamt sind damit heute etwa 20 Chemikalien bekannt, die eine Erhöhung der Metallothioneingehalte bewirken können. Versucht man unter ihnen eine Einteilung vorzunehmen, so ergeben sich im wesentlichen 3 Gruppen:

(1) Substanzen, die zytotoxische oder gewebsreizende Wirkung besitzen, wie Terpentinöl (SOBOCINSKI et al., 1978), Carrageenan (MAITANI und SUZUKI, 1981), bakterielles Endotoxin (SOBOCINSKI et al., 1977, SUZUKI und YAMAMURA, 1979), Ethanol (WAALKES et al., 1984), Isopropanol (SWERDEL und COUSINS, 1984) und Dextrane (MAITANI und SUZUKI, 1982). Hierzu zählen auch reaktive Verbindungen mit elektrophilem Charakter, wie Jodessigsäure (ERGEBNISSE 3c), Methyljodid und Diethylmaleat (KOTSONIS und KLAASSEN, 1979). In diese Gruppe sind darüberhinaus auch Brombenzol (KOTSONIS und KLAASSEN, 1979) und Tetrachlorkohlenstoff (ERGEBNISSE 3e) einzuordnen, wenn man berücksichtigt, daß bei deren Biotransformationen reaktive elektrophile Metaboliten entstehen.

(2) Metallchelatoren, die eventuell Thionein-induzierende Metalle mobilisieren können. Hierzu zählen Penicillamin (ERGEBNISSE 3d) und ein alpha-Mercaptoacrylsäurederivat (GIROUX und LACHMAN, 1984).

(3) Substanzen mit hormonellem Charakter, wie Corticosteroide (KLAASSEN, 1981; KARIN et al., 1981) und Katecholamine (BRADY und HELVIG, 1984).

Versuche, bei diesen Substanzen Struktur-Wirkungs-Beziehungen herzustellen, schlagen bei der Heterogenität der Gruppen fehl. Dies wird unter anderem auch bei den Dextranderivaten deutlich, von denen sowohl Dextransulfat als auch DEAE-Dextran hepatisches Zn-Thionein induziert (MAITANI und SUZUKI, 1982).

Allen Chemikalien gemeinsam ist allerdings die Tatsache, daß sie die endogenen Metallothioneingehalte nicht so weit erhöhen, wie Zn oder andere an Thionein bindende Metalle. Bei keiner der Chemikalienbehandlungen konnte bisher bei Ratte und Maus ein hepatischer Metallothio-

neinspiegel von 300 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht überschritten werden, während Zn-Behandlung Metallothioneingehalte um 800 $\mu\text{g/g}$ (ERGEBNISSE 3b) bewirkte. Eventuell ist die Verfügbarkeit an endogenem Zn bei der Neusynthese von Metallothionein der limitierende Faktor, nachdem das Apoprotein unter physiologischen Bedingungen bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Diese Vorstellung bedeutet allerdings nicht zwangsläufig, daß die Metallothioneinsynthese über Zn vermittelt werden muß. So diskutierten DURNAM et al. (1984) und DURNAM und PALMITER (1984) über in vivo und in vitro Experimente mit Zn-unabhängiger Metallothioneininduktion. Sie erwähnten neben der metall- und glucocorticoidsensitiven Promotorsequenz des Metallothioneingens eine dritte Promotorsequenz, die sensitiv für Substanzen wie bakterielles Endotoxin und Jodessigsäure ist. Zn-Umverteilung wäre dann die Folge und nicht die Ursache der Thionein-Neusynthese. Diese Hypothese einer Zn-unabhängigen Induktion wird auch durch den nicht notwendigerweise erfolgenden Zn-Anstieg in den Geweben bei Metallothionein-Neusynthese gestützt. Zur Deckung des Zn-Bedarfs für neu synthetisiertes Thionein zeigte sich die Möglichkeit eines Zn-Einstroms in das Lebergewebe (durch Jodessigsäure, ERGEBNISSE 3b) über den teilweisen Einstrom verbunden mit einer teilweisen intrazellulären Umverteilung (durch Penicillamin, ERGEBNISSE 3c) bis hin zur alleinigen zytosolischen Umverteilung (durch Tetrachlorkohlenstoff, ERGEBNISSE 3d).

Beim Menschen sind derartige Chemikalien-induzierte Veränderungen der Metallothioneinspiegel bei der therapeutischen Anwendung von Penicillamin denkbar. Die Substanz wird hauptsächlich zur Behandlung der Kupferspeicherkrankheit Morbus Wilson (WALSHE, 1956) und zur Behandlung von rheumatoider Arthritis (JAFFE, 1974; MIEHLKE und JENTSCH, 1979) verwendet. Die von McDONALD und HENNEMANN (1965) vorgeschlagene Dosis von etwa 100 mg/kg/Tag bei kurzzeitiger Gabe zur Auflösung von Cystinsteinen, wird bei Langzeitdosierungen auf etwa 10-40 mg/kg/Tag reduziert (EDELMAN et al., 1984; DE CASTRO et al., 1978; WIESNER et al., 1981). Wenngleich die im Tierversuch verwendeten Dosen nicht direkt auf den Menschen übertragen werden können, ist es doch bemerk-

kenswert, daß eine Dosis von 20 mg/kg, die bei einmaliger Gabe in der Ratte eine Verdopplung des hepatischen Metallothioneingehaltes bewirkte (Abb. 18), beim Menschen zum Teil jahrelang verabreicht wird. Nach allem, was man bisher über die Metallothioneinbiosynthese weiß, läßt sie sich durch wiederholte Dosierung mehr steigern als durch einmalige Gabe. Künftige Studien sollten deshalb klären, ob die bei Patienten verwendeten Penicillamindosen zur Induktion von menschlichem hepatischen Metallothionein führen.

Metallothioneininduktion kann auch durch Veränderung der Metallhomöostase hervorgerufen werden (ERGEBNISSE 3b; KÄGI und NORDBERG, 1979). Bei Patienten mit Tumoren ist der Metabolismus von Zn und Cu gestört (SIGEL, 1981). Obwohl für verschiedene Tumorarten unterschiedliche Veränderungen der Metallspiegel gefunden worden sind, wird für Patienten mit Bronchialkarzinom übereinstimmend ein Anstieg der Zn-Gehalte beschrieben (zusammenfassende Übersicht bei VAN RIG und PORIES, 1981). In diesem Zusammenhang ist es bedeutsam, daß von den in dieser Arbeit untersuchten 13 Leberproben diejenige eines Patienten mit Bronchialkarzinom den höchsten Metallothioneingehalt aufwies (Tab. 13). Leider standen keine Proben des Bronchialgewebes zur Verfügung. Interessanterweise wird das Tumorwachstum durch Zn-Mangel unterdrückt und die Tumorüberlebensrate durch geringen Zn-Überschuß erhöht (VAN RIG und PORIES, 1981). Das steht in Einklang mit einer hypothetischen physiologischen Funktion von Metallothionein als Zn-Donor für Zn-benötigende Apoenzyme (UDOM und BRADY, 1980). Von den über 200 Zn-haltigen Metalloenzymen sind Thymidin-Kinase, DNA-Polymerasen und RNA-Polymerasen direkt an Proliferationsvorgängen beteiligt (DI SILVESTRO und COUSINS, 1983; VALLEE, 1983; SUGARMAN, 1983). Deshalb könnte schnell proliferierendes Gewebe eines Tumors genauso wie die schnell proliferierende Leber im fötalen oder neonatalen Zustand und die adulte Leber nach partieller Hepatektomie einen vermehrten Bedarf an Zn bedingen. Das wiederum könnte mit den erhöhten Metallothioneingehalten in diesen Fällen in Zusammenhang stehen.

Eine weitere Beeinflussung der endogenen Metallothioneingehalte kann durch die Speicherung des nicht-essentiellen Schwermetalls Cd entstehen. Dabei lagen die in den Nierenrinden von 40-60jährigen Individuen gemessenen Gesamt-Cd-Gehalte zwischen 5 und 99 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht (Abb. 23). Hiermit wird im Einzelfall bis zur Hälfte derjenigen Konzentration erreicht, die mit 200 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht für die menschliche Nierenrinde als Toxizitätsschwellenwert ("kritische Konzentration") erachtet wird (FRIBERG et al., 1974; FAO/WHO 1972). Wenngleich auch für den Menschen die Angaben dieser "kritischen Konzentration" zwischen 160 $\mu\text{g/g}$ (ROELS et al., 1981) und 319 $\mu\text{g/g}$ (ELLIS et al., 1981) schwanken, so ist doch in keinem Individuum der hier vorliegenden Untersuchung ein Sicherheitsfaktor von wenigstens 100 gewahrt, wie er sonst bei toxikologischen Schwellenwertsbetrachtungen üblich ist (MAIER-BODE, 1978).

Die Angabe der "kritischen Konzentration" für Cd hat in der Literatur zu einiger Verwirrung geführt (FRIBERG, 1984). Diese "kritische Konzentration" stellt keine 100 %-ige Schwellenangabe für das Auftreten einer Nierenfunktionsstörung dar, vielmehr sind unterhalb dieser Konzentration statistisch mehr als 90 % der Individuen vor einem Cd-induzierten Nierenschaden geschützt (ROELS et al., 1983).

Das Konzept der kritischen Cd-Konzentration basiert auf dem undifferenzierten Gesamt-Cd-Gehalt der Nierenrinde. Aus zwei Gründen sind hiergegen Einwände anzubringen.

Erstens scheint der Cd-Spiegel der Niere kein verlässliches Maß für das individuelle Risiko zu sein. Man beobachtet nämlich bei der Ratte als Cd-bedingte Schadwirkung eine irreversible Proteinurie und Glukosurie (SHAIKH und HIRAYAMA, 1979). Gleichzeitig fließt dabei aber auch Cd in proteingebundener Form in den Urin, wodurch der Cd-Gehalt der Niere verringert wird. Durch den Vergleich berufsmäßig Cd-exponierter Personen mit und ohne Nierenfunktionsstörung konnten derartige Überlegungen inzwischen für den Menschen bestätigt werden (SHAIKH und TOHYAMA, 1984).

Zweitens bleibt bei der Betrachtung des Gesamt-Cd-Gehalts die Proteinbindung des Metalls unberücksichtigt. Nachdem aber in Geweben kein Cd

in freier Form vorliegt (ANDERSEN, 1984) und die Reaktivität des Schwermetalls von der Bindungsstärke an den jeweiligen endogenen Liganden abhängt, erscheint eine genauere Differenzierung zwischen den Cd-Bindungsformen wünschenswert.

Nachdem Thionein-gebundenes Cd als relativ inert erachtet wird, solange das Metalloprotein intakt bleibt (FRIBERG et al., 1974; NORDBERG, 1978), scheint die Toxizität des Schwermetalls zum Großteil durch das nicht an Thionein gebundene Cd bedingt zu sein. NOMIYAMA und Mitarbeiter bestimmten einen Toxizitätsschwellenwert für nicht Thionein-gebundenes Cd in der Nierenrinde, der für Kaninchen und Affe bei etwa 35 $\mu\text{g Cd/g}$ Frischgewicht liegt (NOMIYAMA und NOMIYAMA, 1980; NOMIYAMA et al., 1980). Bisher gibt es keine Untersuchungen über die Existenz und Höhe eines solchen Schwellenwertes beim Menschen. In der vorliegenden Arbeit ergaben sich nicht Thionein-gebundene Cd-Anteile in der menschlichen Nierenrinde von 11,3; 6,1 und 12,8 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht (geometrisches Mittel) für Nichtraucher, Raucher und starke Raucher. Das sind 76, 43 und 44 % der jeweiligen Gesamt-Cd-Gehalte in den Nierenrinden. Weitere Untersuchungen sind hier nötig, um einen möglichen Schwellenwert des nicht Thionein-gebundenen Cd für den Menschen zu definieren.

Für die Rattenniere konnte gezeigt werden, daß einmal an Thionein gebundenes Cd trotz funktionierendem Metallothionein-Katabolismus lange in dieser Bindungsform erhalten bleibt (FRIBERG, 1984; NORDBERG, 1984). Diese Persistenz von Cd-Thionein auch über die Lebensdauer des Proteins hinaus, ist durch laufende Neusynthese, die dem Katabolismus die Waage hält, gekennzeichnet (KOBAYASHI et al., 1982; SHAIKH und SMITH, 1976; SHAIK und SMITH, 1977). Neben dem nicht essentiellen Cd wurden bei allen 47 Proben der menschlichen Nierenrinde auch die essentiellen Metalle Zn und Cu in Metallothionein gefunden. So reichte das Spektrum von Zn als hauptsächlicher Metallkomponente (90%) zu der Probe, in der Cd mit 90% die hauptsächliche Metallkomponente im Metallothionein darstellte. Cu war in keinem Fall das vorherrschende Metall in dem Protein.

Die Speicherung der essentiellen Metalle Zn und Cu und die damit verbundene Möglichkeit zur Regulation von Transport und Stoffwechsel dieser essentiellen Metalle wird von einigen Autoren als eine der möglichen Funktionen von Metallothionein angesehen (BRADY, 1982; COUSINS, 1983). Will man vom heutigen Wissensstand die physiologischen Funktionen von Metallothionein beschreiben, so muß seine Rolle bei der Resorption, Organotropie und Toxizität von Cd genauso Erwähnung finden, wie seine Beteiligung am Transport und an der Homöostase der essentiellen Metalle Zn und Cu, die Reaktivität seiner Thiolatgruppen und seine mögliche Beteiligung an der Regulation der Proliferationsvorgänge im fötalen und neonatalen Zustand sowie bei maligner Entartung der Gewebe. Auf der Grundlage des derzeitigen Kenntnisstandes über Metallothionein kann davon ausgegangen werden, daß diese Funktionen durch Induktion von Metallothionein und Veränderung der Metallspeicherung in dem Protein beeinflußt werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Albergoni, V., Cassini, A., Favero, N. und Rocco, G.P. (1975) "Effect of Penicillamine on Some Metals and Metalloproteins in the Rat", *Biochem. Pharmacol.* 24, 1131-1133
- Andersen, O. (1984) "Chelation of Cadmium", *Environ. Health Perspect.* 54, 249-266
- Bell, J.U. (1979) "Native Metallothionein Levels in Rat Hepatic Cytosol during Perinatal Development", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 50, 101-107
- Bergmeyer, H.U., Berndt, E., Schmidt, F. und Stork, H. (1970) "D-Glukose" in : "Methoden der enzymatischen Analyse", Bd. II, 2. Aufl. (Bergmeyer, H.U., ed.), Verlag Chemie, Weinheim, p. 1163-1168
- Berry, M.N. and Friend, D.S. (1969) "High Yield Preparation of Isolated Rat Liver Parenchymal Cells. A Biochemical and Fine Structural Study", *J. Cell Biol.* 43, 506-520
- Brady, F.O. (1981) "Synthesis of Rat Hepatic Zinc Thionein in Response to the Stress of Sham Operation", *Life Sci.* 28, 1647-1654
- Brady, F.O. (1982) "The Physiological Function of Metallothionein", *Trends Biochem. Sci.* 7, 143-145
- Brady, F.O. and Helvig, B. (1984) "Effect of Epinephrine and Norepinephrine on Zinc Thionein Levels and Induction in Rat Liver", *Am. J. Physiol.* 247, E318-E322
- Brownlee, K.A. (1965) "Statistical Theory and Methodology in Science and Engineering", Wiley, New York
- Bücher, T., Brauser, B., Conze, A., Klein, F., Langguth, O. and Sies, H. (1972) "State of Oxidation-Reduction and State of Binding in the Cytosolic NADH-System as Disclosed by Equilibration with Extracellular Lactate/Pyruvate in Hemoglobin-Free Perfused Rat Liver", *Eur. J. Biochem.* 27, 301-317
- Bühler, R.H.O. and Kägi, J.H.R. (1974) "Human Hepatic Metallothioneins", *FEBS Letters* 39, 229-324

- Cagen, S.Z. and Klaassen, C.D. (1979) "Protection of Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity by Zinc: Role of Metallothionein", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 51, 107-116
- Cagen, S.Z. and Klaassen, C.D. (1980) "Binding of Glutathione-Depleting Agents to Metallothionein", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 54, 229-237
- Chang, C.C., Vander Mallie, R.J. and Garvey, J.S. (1980a) "A Radioimmunoassay for Human Metallothionein", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55, 94-102
- Chang, C.C., Lauwerys, R., Bernard, A., Roels, H., Buchet, J.P. and Garvey, J.S. (1980b) "Metallothionein in Cadmium-Exposed Workers", *Environ. Res.* 23, 422-428
- Cherian, M.G., Goyer, R.A. and Delaquerriere-Richardson, L. (1976) "Cadmium-Metallothionein-Induced Nephropathy", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 38, 399-408
- Christie, N.T. and Costa, M. (1984) "Review. *In Vitro* Assessment of the Toxicity of Metal Compounds", *Biol. Trace Elem. Res.* 6, 139-158
- Conover, W.J. (1980) "Practical Nonparametric Statistics, 2nd ed.", Wiley, New York
- Corrigan, A.J. and Huang, P.C. (1983) "Cadmium and Zinc Flux in Wild-Type and Cadmium-Resistant CHO Cells", *Biol. Trace Element Res.* 5, 25-33
- Cousins, R.J. (1983) "Metallothionein-Aspects Related to Copper and Zinc Metabolism", *J. Inher. Metab. Dis.* 6, Suppl. 1, 15-21
- de Castro, F.J., Jaeger, R.W. and Rolfe, U.T. (1978) "Penicillamine Suspension", *Clinical Toxicology* 12, 607
- Deschatrette, J. and Weiss, M.C. (1974) "Characterization of Differentiated and Dedifferentiated Clones of a Rat Hepatoma", *Biochimie* 56, 1603-1611
- Deschatrette, J., Moore, E.E., Dubois, M. and Weiss, M.C. (1980) "Differentiated Variants of a Rat Hepatoma: Reversion Analysis", *Cell* 19, 1043-1051
- DiSilvestro, R.A., Cousins, R.J. (1983) "Physiological Ligands for Copper and Zinc", *Ann. Rev. Nutr.* 3, 261-288

- Drasch, G.A. (1983) "An Increase of Cadmium Body Burden for this Century - An Investigation on Human Tissues", *The Science of the Total Environment* 26, 111-119
- Durnam, D.M. and Palmiter, R.D. (1981) "Transcriptional Regulation of the Mouse Metallothionein-I Gene by Heavy Metals", *J. Biol. Chem.* 256, 5712-5716
- Durnam, D.M., Hofmann, J.S., Quaife, C.J., Benditt, E.P., Chen H.Y., Brister, R.L. and Palmiter, R.D. (1984) "Induction of Mouse Metallothionein-I mRNA by Bacterial Endotoxin is Independent of Metals and Glucocorticoid Hormones", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1053-1056
- Durnam, D.M. and Palmiter, R.D. (1984) "Induction of Metallothionein-I mRNA in Cultured Cells by Heavy Metals and Iodoacetate: Evidence for Gratuitous Inducers", *Molec. Cell. Biol.* 4, 484-491
- Eaton, D.L., Stacey, N.H., Wong, K.L. and Klaassen, C.D. (1980) "Dose-Response Effects of Various Metal Ions on Rat Liver Metallothionein, Glutathione, Heme Oxygenase, and Cytochrome P-450", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55, 393-402
- Edelman, J., Maguire, K.F. and Owen, E.T. (1984) "Eosinophilia in Rheumatoid Patients Treated with D-Penicillamine", *J. Rheumatol.* 11, 624-625
- Elinder, C.G., Kjellström, T., Friberg, L., Lind, B. and Linnman, L. (1976) "Cadmium in Kidney Cortex, Liver and Pancreas from Swedish Autopsies", *Arch. Environ. Health* 31, 292-302
- Elinder, C.G. and Kjellström, T. (1977) "Cadmium Concentration in Samples of Human Kidney Cortex from the 19th Century", *Ambio* 6, 270-273
- Ellis, K.J., Vartsky, D., Zanzi, I., Cohn, S.H. and Yasumura, S. (1979) "Cadmium: *In Vivo* Measurement in Smokers and Nonsmokers", *Science* 205, 323-325
- Ellis, K.J., Morgand, W.D., Zanzi, I., Yasumura, S., Vartsky, D. and Cohn, S.H. (1981) "Critical Concentrations of Cadmium in Human Renal Cortex: Dose-Effect Studies in Cadmium Smelter Workers", *J. Tox. Environ. Health* 7, 691-703
- Ellman, G.L. (1959) "Tissue Sulfhydryl Groups", *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 70-77

- Endresen, L. Bakka, A., Glennas, A., Tveit, K.M. and Rugstad, H.E. (1983) "Stability of Cadmium Resistance and Metallothionein Levels In Vitro and In Vivo", Toxicol. Appl. Pharmacol. 67, 274-283
- FAO/WHO (1972) "Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives: Evaluation of Certain Food Additives and the Contaminants Mercury, Lead and Cadmium", FAO and WHO, Genf
- Foulkes, E.C. (ed.) (1982) "Biological Roles of Metallothionein", Elsevier, North-Holland
- Friberg, L., Piscator, M., Nordberg, G.F. and Kjellström, T. (1974) "Cadmium in the Environment, 2nd ed.", CRC Press, Cleveland
- Friberg, L. (1984) "Cadmium and the Kidney", Environ. Health Perspect. 54, 1-11
- Geller, B.L. and Winge, D.R. (1982) "Metal Binding Sites of Rat Liver Cu-Thionein", Arch. Biochem. Biophys. 213, 109-117
- Gick, G.G., McCarthy Jr., K.S. and McCarthy Sr., K.S. (1981) "The Role of Metallothionein Synthesis in Cadmium and Zinc-Resistant CHO K 1 M Cells", Exp. Cell Res. 132, 23-30
- Gick, G.G. and McCarthy Sr., K.S. (1983) "Reduced Cd²⁺ Accumulation and Elevated Metallothionein Levels in a Cd²⁺ and Zn²⁺-Resistant Clonal CHO K 1 Cell Line", Toxicology 26, 275-283
- Giroux, E., Lachmann, P.J. (1984) "Kidney and Liver Metallothionein in Rats after Administration of an Organic Compound", J. Biol. Chem. 259, 2658-3662
- Guder, W.G. (1979) "Stimulation of Renal Gluconeogenesis by Angiotensin II", Biochim. Biophys. Acta 584, 507-519
- Hutton, M. (1983) "Sources of Cadmium in the Environment", Ecotoxicol. Environ. Safety 7, 9-24
- Jaffe, I.A. (1974) "The Treatment of Rheumatoid Arthritis with D-Penicillamine", (Ott, V.R. and Schmidt, K.L., eds.), Steinkopf Verlag, Darmstadt, 42, p. 84-94
- Kägi, J.H.R., Himmelhoch, S.R., Whanger, P.D., Bethune, P.D. and Vallee, B.L. (1974) "Equine Hepatic and Renal Metallothioneins. Purification, Molecular Weight, Amino Acid Composition and Metal Content", J. Biol. Chem. 249, 3537-3542

- Kägi, J., Kissling, M.M., Bühler, R.H.O. und Kojima, Y. (1979) "Metallothionein, ein Schlüsselprotein des Zinkmetabolismus" in: "Zinkstoffwechsel" (Kruse-Jarres, J.-D., ed.), TM Verlag, Bad Oeynhausen, p. 29-37
- Kägi, J.H.R. and Nordberg, M. (eds.) (1979) "Metallothionein", Birkhäuser, Basel
- Karin, M., Andersen, R.D. and Herschman, H.R. (1981) "Induction of Metallothionein mRNA in HeLa Cells by Dexamethason and by Heavy Metals", *Eur. J. Biochem.* 118, 527-531
- Kissling, M.M. and Kägi, J.H.R. (1979) "Amino Acid Sequence of Human Hepatic Metallothioneins" in: "Metallothionein" (Kägi, J.H.R. and Nordberg, M., eds.), Birkhäuser, Basel, p. 145-152
- Klaassen, C.D. (1981) "Induction of Metallothionein by Adrenocortical steroids", *Toxicology* 20, 275-279
- Kobayashi, S. and Kimura, M. (1980) "Different Inducibility of Metallothionein in Various Mammalian Cells *In Vitro*", *Toxicol. Lett.* 5, 357-362
- Kobayashi, S., Imano, M. and Kimura, M. (1982) "Turnover of Metallothionein in Mammalian Cells" in: "Biological Roles of Metallothionein" (Foulkes, E. C., ed.), Elsevier, North Holland, p. 305-322
- Kotsonis, F.N., Klaassen, C.D. (1979) "Increase in Hepatic Metallothionein in Rats Treated with Alkylating Agents", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 51, 19-27
- Leber, A.P. and Miya, T.S. (1976) "A Mechanism for Cadmium and Zinc-Induced Tolerance to Cadmium Toxicity: Involvement of Metallothionein", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 37, 403-404
- Lewis, G.P., Jusko, W., Coughlin, L. and Hartz, S. (1972a) "Contribution of Cigarette Smoking to Cadmium Accumulation in Man", *Lancet* 1, 291-292
- Lewis, G.P., Jusko, W.J., Coughlin, L.L. and Hartz, S. (1972b) "Cadmium Accumulation in Man: Influence of Smoking, Occupation, Alcohol Habit and Disease", *J. Chronic Dis.* 25, 717-726
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Lewis Farr, A. and Randall, R.J. (1951) "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent", *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- Maier-Bode, H. (1978) "Pflanzenschutzmittel-Rückstände", Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart

- Maitani, T. and Suzuki, K.T. (1981) "Alteration of Essential Metal Levels and Induction of Metallothionein by Carrageenan Injection", *Biochem. Pharmacol.* 30, 2353-2355
- Maitani, T. and Suzuki, K.T. (1982) "Induction of Metallothionein in Liver and Changes of Essential Metal Levels in Selected Tissues by Three Dextran Derivatives", *Biochem. Pharmacol.* 31, 3051-3055
- Margoshes, M. and Vallee, B.L. (1957) "A Cadmium Protein from Equine Kidney Cortex", *J. Am. Chem. Soc.* 79, 4813
- McDonald, J.E. and Hennemann, P.H. (1965) "Stone Dissolution *In Vivo* and Control of Cystinuria with D-Penicillamine", *New Engl. J. Med.* 273, 578-583
- Miehlke, K. und Jentsch, D. (1979) "Der heutige Stand der D-Penicillamin-Therapie der chronischen Polyarthritits", *Therapiewoche* 23, 3072-3081
- Minkel, D.T., Poulsen, K., Wielgus, S., Show, C.F. and Petering, D.H. (1980) "On the Sensitivity of Metallothioneins to Oxidation during Isolation", *Biochem. J.* 191, 475-485
- NIEHS (1984) "Metallothionein and Cadmium Nephrotoxicity", *Environ. Health Perspect.* 54, 1-372
- Nomiyama, K. and Nomiyama, H. (1980) "Biological Function of Metallothionein (2). Association of Metallothionein to the Critical Concentration in Rabbits given Subcutaneous Injections of Cadmium for a Prolonged Period", *Jpn. J. Hyg.* 35, 233
- Nomiyama, K., Nomiyama, H., Akahori, F. and Masaoka, T. (1980) "Health Effects of a Small Amount of Dietary Cadmium on Monkeys (12). Metallothionein and the Critical Concentration of Cadmium", *Kankyo Hoken Report* 46, 155-159
- Nordberg, G.F. (1971) "Effects of Acute and Chronic Cadmium Exposure on the Testicles of Mice", *Environ. Physiol.* 1, 171-187
- Nordberg, M. (1978) "Studies on Metallothionein and Cadmium", *Environ. Res.* 15, 381-404
- Nordberg, M. (1984) "General Aspects of Cadmium: Transport, Uptake and Metabolism by the Kidney", *Environ. Health Perspect.* 54, 13-20
- Nriagu, J.O. (1979) "Global Inventory of Natural and Anthropogenic Emission of Trace Metals to the Atmosphere", *Nature* 279, 409-411

- Oh, S.H., Deagen, J.T., Whanger, P.D. and Weswig, P.H. (1978) "Biological Function of Metallothionein. V. Its Induction in Rats by Various Stresses", *Am. J. Physiol.* 234, E282-E285
- Onosaka, S., Keiichi, T., Doi, M. and Kunio, O. (1978) "A Simplified Procedure for Determination of Metallothionein in Animal Tissues", *Eisei Kagaku* 24, 128-131
- Onosaka, S. and Cherian, M.G. (1981) "The Induced Synthesis of Metallothionein in Various Tissues of Rat in Response to Metals. I. Effect of Repeated Injections of Cadmium Salts", *Toxicology* 22, 91-101
- Onosaka, S. and Cherian, M.G. (1982a) "Comparison of Metallothionein Determination by Polarographic and Cadmium Saturation Methods", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63, 270-274
- Onosaka, S. and Cherian, M.G. (1982b) "The Induced Synthesis of Metallothionein in Various Tissues of Rats in Response to Metals. II. Influence of Zinc Status and Specific Effect on Pancreatic Metallothionein", *Toxicology* 23, 11-20
- Paul, J. (1979) "Zell- und Gewebekulturen", de Gruyter, Berlin
- Perry, H.M. Jr., Erlanger, M., Yunice, A., Schoepple, E. and Perry, E.F. (1970) "Hypertension and Tissue Metal Levels Following Intravenous Cadmium, Mercury and Zinc", *Amer. J. Physiol.* 219, 755-761
- Piotrowski, J.K., Bolanowska, W. and Sapata, A. (1973) "Evaluation of Metallothionein Content in Animal Tissues", *Acta Biochim. Polon.* 20 (3), 207-215
- Piscator, M. and Lind, B. (1972) "Cadmium, Zinc, Copper and Lead in Human Renal Cortex", *Arch. Environ. Health* 24, 426-431
- Pitot, H.C., Peraino, C., Morse, P.A. and Potter, V.R. (1964) "Hepatoma in Tissue Culture Compared with Adapting Liver *In Vivo*", *Nat. Cancer Inst. Monograph* 13, 229-242
- Probst, G.S., Bousquet, W.F. and Miya, T.S. (1977) "Correlation of Hepatic Metallothionein Concentration with Acute Cadmium Toxicity in the Mouse", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 39, 61-69
- Pulido, P., Kägi, J.H.R. and Vallee, B.L. (1966) "Isolation and Some Properties of Human Metallothionein", *J. Biol. Chem.* 5, 1768-1777

- Reuber, M.D. (1961) "A Transplantable Bile-Secreting Hepatocellular Carcinoma in the Rat", J. Nat. Cancer. Inst. 26, 891-899
- Roberts, S.A., Miya, I.S. and Schnell, R.C. (1976) "Tolerance Development to Cadmium-Induced Alteration of Drug Action", Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 14, 197-200
- Roberts, S.A. and Schnell, R.C. (1982) "Cadmium Inhibition of In Vitro Hepatic Oxidative Drug Metabolism in the Rat: Comparison between Ionic Cadmium and Cadmium-Thionein", Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 35, 349-352
- Roels, H.A., Lauwerys, R.R., Buchet, J.-P., Bernard, A., Chettle, D.R., Harvey, T.C. and Al-Haddad, I.K. (1981) "In Vivo Measurement of Liver and Kidney Cadmium in Workers Exposed to this Metal: Its Significance with Respect to Cadmium in Blood and Urine", Environ. Res. 26, 217-240
- Roels, H., Lauwerys, R. and Dardenne, A.N. (1983) "The Critical Level of Cadmium in Human Renal Cortex: A Reevaluation", Toxicol. Lett. 15, 357-360
- Sasser, L.B. and Jarbol, G.E. (1977) "Intestinal Absorption and Retention of Cadmium in Neonatal Rat", Toxicol. Appl. Pharmacol. 41, 423-431
- Sato, M. and Nagai, Y. (1980) "Mode of Existence of Cadmium in Rat Liver and Kidney after Prolonged Subcutaneous Administration", Toxicol. Appl. Pharmacol. 54, 90-99
- Schramel, P., Wolf, A., Seif, R., und Klose, B.J. (1980) "Eine neue Apparatur zur Druckveraschung von biologischem Material" Fresenius, Z. Anal. Chem. 302, 62-64
- Schramel, P., Klose, B.J. und Hasse, S. (1982) "Die Leistungsfähigkeit der ICP-Emissionsspektroskopie zum Nachweis von Spurenelementen in biologisch-medizinischen und in Umweltproben", Fresenius, Z. Anal. Chem. 310, 209-216
- Schwarz, L.R. and Greim, H. (1980) "Isolated Hepatocytes: An Analytical Tool in Hepatotoxicology" in: "Frontiers in Liver Disease" (Berk, P.D. and Chalmers, T.C., eds.), Thieme Verlag, Stuttgart, p. 61-79
- Seagrave, J., Hildebrand, C.E. and Enger, M.D. (1983) "Effects of Cadmium on Glutathione Metabolism in Cadmium Sensitive and Cadmium Resistant Chinese Hamster Cell Lines", Toxicology 29, 101-107

- Sedlak, J. and Lindsay, H.R. (1968) "Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent", *Analyt. Biochem.* 25, 192-205
- Shaikh, Z.A. and Smith, J.C. (1976) "The Biosynthesis of Metallothionein in Rat Liver and Kidney after Administration of Cadmium", *Chem.-Biol. Interact.* 15, 327-336
- Shaikh, Z.A. and Smith, J.C. (1977) "The Mechanism of Hepatic and Renal Metallothionein Biosynthesis in Cadmium-Exposed Rats", *Chem.-Biol. Interact.* 16, 161-171
- Shaikh, Z.A. and Hirayama, K. (1979) "Metallothionein in the Extracellular Fluids as an Index of Cadmium Toxicity", *Environ. Health Perspect.* 28, 267-271
- Shaikh, Z.A. and Tohyama, C. (1984) "Urinary Metallothionein as an Indicator of Cadmium Body Burden and of Cadmium-Induced Nephrotoxicity", *Environ. Health Perspect.* 54, 171-174
- Sharma, R.P., Kjellström, T. and McKenzie, J.M. (1983) "Cadmium in Blood and Urine among Smokers and Non-Smokers with high Cadmium Intake via Food", *Toxicology* 29, 163-171
- Sies, H. and Summer, K.H. (1975) "Hydroperoxide-Metabolizing Systems in Rat Liver", *Eur. J. Biochem* 57, 503-512
- Sigel, H., ed. (1981) "Metal Ions in Biological Systems. Vol. 10: Carcinogenicity and Metal Ions", Marcel Dekker, New York
- Sobocinski, P.Z., Canterbury Jr., W.J. and Mapes, C.A. (1977) "Induction of Hepatic Zinc-Binding Proteins by Endotoxin and Leucocytic Endogenous Mediators (LEM)", *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 36, 1000
- Sobocinski, P.Z., Canterbury Jr., W.J., Mapes, C.A., Dinterman, R.E., Hauer, E.C. and Abeles, F.B. (1978) "Hypo zincemia of Inflammation: Sequestration of Zinc by Hepatic Metallothioneins", *Fed. Proc. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 27, 890
- Song, M.K. and Borowsky, S. (1984) "Effects of Alcohol and Carbon Tetrachloride on Metallothionein Metabolism in Rat Small Intestine", *Nutrit. Reports Internat.* 30, 179-187
- Squibb, K.S. and Fowler, B.A. (1984) "Intracellular Metabolism and Effects of Circulating Cadmium-Metallothionein in the Kidney", *Environ. Health Perspect.* 54, 31-35

- Stacey, N.H. and Klaassen, C.D. (1980) "Cadmium Uptake by Isolated Rat Hepatocytes", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 55, 448-455
- Sugarman, B. (1983) "Zinc and Infection", *Rev. Infect. Dis.* 5, 137-147
- Sugawara, N., Aoshima, K. and Kasuya, M. (1983) "Effect of Cadmium Chloride and Cd-Metallothionein on the Nervous Tissue Culture", *Toxicol. Lett.* 16, 95-101
- Summer, K.H., Rozman, K., Coulston, F. and Greim, H. (1979) "Urinary Excretion of Mercapturic Acids in Chimpanzees and Rats", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 50, 207-212
- Suzuki, K.T. and Yamamura, M. (1979) "Induction of Hepatic Zinc-Thionein in Rat by Endotoxin", *Biochem. Pharmacol.* 29, 2260
- Suzuki, K.T. and Yamamura, M. (1980) "Isolation and Characterization of Metallothionein Dimers", *Biochem. Pharmacol.* 29, 689-692
- Suzuki, K.T. and Maitani, T. (1981) "Metal-Dependent Properties of Metallothionein", *Biochem. J.* 199, 289-295
- Suzuki, K.T., Yamamura, M., Yamada, Y.K. and Shimizu, F. (1981) "Distribution of Cadmium in Heavily Cadmium-Accumulated Rat Liver Cytosols: Metallothionein and Related Cadmium-Binding Proteins", *Toxicol. Lett.* 8, 105-114
- Suzuki, K.T., Ohnuki, R. and Yaguchi, K. (1983) "Post-Mortem and *In Vitro* Dimerization of Metallothionein in Cadmium-Accumulated Rat Liver and Kidney", *Toxicol. Lett.* 16, 77-84
- Suzuki, K.T. (1984) "Studies of Cadmium Uptake and Metabolism by the Kidney", *Environ. Health Perspect.* 54, 21-30
- Swerdel, M.R. and Cousins, R.J. (1984) "Changes in Rat Liver Metallothionein and Metallothionein mRNA Induced by Isopropanol", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 175, 522-529
- Tan, E.L., Williams, M.W., Shenley, R.L., Perdue, S.W., Hayden, T.L., Turner, J.E. and Hsie, A.W. (1984) "The Toxicity of Sixteen Metallic Compounds in Chinese Hamster Ovary Cells", *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 74, 330-336
- Tietze, F. (1969) "Enzymic Method for Quantitative Determination of Nanogram Amounts of Total and Oxidized Glutathione: Applications to Mammalian Blood and Other Tissues", *Anal. Biochem.* 27, 502-522

- UBA, Umweltbundesamt Berlin (1981) "Cadmium-Bericht", Texte 1/81, Berlin
- Udom, A.O. and Brady, F.O. "Reactivation In Vitro of Zinc-Requiring Apo-Enzymes by Rat Liver Zinc-Thionein", Biochem. J. 187, 329-335
- Valberg, L.S., Haist, J., Cherian, M.G., Delaquerriere-Richardson, L. and Goyer, R.A. (1977) "Cadmium-Induced Enteropathy: Comparative Toxicity of Cadmium Chloride and Cadmium-Thionein", J. Toxicol. Environ. Health 2, 963-975
- Vallee, B.L. (1983) "A Role for Zinc in Gene Expression", J. Inher. Metab. Dis. 6 Suppl. 1, 31-33
- Vander Mallie, R.J. and Garvey, J.S. (1979) "Radioimmunoassay of Metallothioneins", J. Biol. Chem. 254, 8416-8421
- van Rigg, A.M. and Pories, W.J. (1981) "Zinc and Tumor Growth" in: "Metal Ions in Biological Systems. Vol. 10: Carcinogenicity and Metal Ions" (Sigel, H., ed.), Marcel Dekker, New York, p. 207-251
- Vasak, M. and Kägi, J.H.R. (1983) "Spectroscopic Properties of Metallothionein" in: "Metal Ions in Biological Systems. Vol. 15: Zinc and its Role in Biology and Nutrition" (Sigel, H., ed.), Marcel Dekker, New York, p. 213-273
- Waalkes, M.P., Hjelle, J.J. and Klaassen, C.D. (1984) "Transient Induction of Hepatic Metallothionein following Oral Ethanol Administration", Toxicol. Appl. Pharmacol. 73, 230-236
- Waku, K., Hayakawa, F. and Nakazawa, Y. (1980) "The Effect of Cadmium Ions and Cadmium-Metallothionein on the Activities of Phospholipid-Synthesizing Enzymes of Rat Liver Microsomes In Vitro", Arch. Biochem. Biophys. 204 (1), 288-293
- Walshe, J.M. (1956) "Penicillamine, a New Oral Therapy for Wilson's Disease", Amer. J. Med. 21, 487-495
- Webb, M. (1975) "The Metallothioneins", Biochem. Soc. Trans. 3, 632-634
- Webb, M. and Etienne, A.T. (1977) "Studies on the Toxicity and Metabolism of Cadmium-Thionein", Biochem. Pharmacol. 26, 25-30
- Webb, M. and Cain, K. (1982) "Functions of Metallothioneins", Biochem. Pharmacol. 31, 137-142

- Weiner, A.L. and Cousins, R.J. (1980) "Copper Accumulation and Metabolism in Primary Monolayer Cultures of Rat Liver Parenchymal Cells", *Biochim. Biophys. Acta* 629, 113-125
- Weser, U. ed. (1979) "Metalloproteins", Thieme Verlag, Stuttgart
- Whanger, P.D. and Ridlington, J.W. (1982) "Role of Metallothionein in Zinc Metabolism" in: "Biological Roles of Metallothionein" (Foulkes, E.C., ed.), Elsevier, North-Holland, p. 263-277
- Wiesner, R.H., Dickson, E.R., Carlson, G.R., McPhaul, L.W. and Go, V.L.W. (1981) "The Pharmacokinetics of D-Penicillamine in Man", *J. Rheumatol. (Suppl. 7)* 8, 51-55
- Winge, D.R. and Miklossy, K.-A. (1982a) "Domain Nature of Metallothionein", *J. Biol. Chem.* 257, 3471-3476
- Winge, D.R. and Miklossy, K.-A. (1982b) "Differences in the Polimorphic Forms of Metallothionein", *Arch. Biochem. Biophys.* 214, 80-88
- Yoshida, T., Ito, Y., Suzuki, Y. and Uchujama, M. (1976) "Inhibition of Hepatic Drug Metabolizing Enzyme by Cadmium in Mice", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 15, 402-405
- Yoshikawa, H. and Ohta, H. (1982) "Interaction of Metals and Metallothionein" in "Metallothionein" (Kägi, J.H.R. and Nordberg, M., eds.), Birkhäuser, Basel, p. 11-23

ZUSAMMENFASSUNG

1. Für die Metallothioneinbestimmung wurde ein schnell durchzuführender Test ausgearbeitet, der sensitiv genug ist, Metallothioneingehalte ab $2 \mu\text{g/g}$ Frischgewicht zu bestimmen. Dieser Test hat sich als empfindlich genug herausgestellt, das Protein in elf bisher untersuchten Geweben von Säugetieren zu erfassen.

2. Es wurde die Rolle von Metallothionein in verschiedenen Zellsystemen untersucht. CdCl_2 erwies sich dabei als effektiver Induktor von Metallothionein in Hepatomzelllinien, wobei die Fähigkeit zur Neusynthese von Metallothionein bei differenzierten Zelllinien ausgeprägter war, als bei dedifferenzierten Zelllinien.

Durch Zn-Vorbehandlung von Ratten konnten die endogenen Metallothioneingehalte frisch isolierter Zellen von Leber und Niere um den Faktor 100 bei Hepatozyten bzw. 10 bei Nierentubuluszellfragmenten gesteigert werden. Diese Zellen wurden als gutes Modell für mechanistische Untersuchungen der Metalltoxizität und für Metallverteilungsstudien etabliert.

Die Aufnahme von Cd in Hepatozyten war etwa auf ein Drittel verringert, wenn das Metall im Vergleich zu CdCl_2 in Thionein-gebundener Form im Medium angeboten wurde. Bei den Hepatozyten mit erhöhten Zn-Thioneingehalten lag dabei, im Gegensatz zu den "Kontrollhepatozyten", der Großteil des im Zytosol aufgenommenen Cd in hitzestabiler Form vor. Nierentubuluszellen mit erhöhten intrazellulären Zn-Thioneingehalten zeigten eine Hemmung der Glukoneogenese erst bei höheren Cd-Konzentrationen, außerdem war die Glukoneogenese weniger gehemmt, wenn Cd in Thionein-gebundener Form im Inkubationsmedium vorlag. In diesem Zusammenhang erfüllt Metallothionein eine intrazelluläre Schutzfunktion vor Cd-vermittelter Toxizität.

3. Die höchsten Metallothioneingehalte von 11 Organen und Geweben in Wistar Ratten wiesen die Niere und das Gehirn auf. Diese basalen Gehalte ließen sich durch Zn am stärksten im Pankreas und durch Nichtmetalle am stärksten in der Leber vermehren. Die Metallothionein-induzierende Wirkung von Jodessigsäure, Penicillamin und Tetrachlorkohlenstoff wurde näher untersucht. Zn, das in neu synthetisiertes hepatisches Thionein eingelagert wird, scheint im Falle der Jodessigsäure durch Einstrom in die Leber, im Falle von Tetrachlorkohlenstoff durch intrazytosolische Umverteilung und im Falle von Penicillamin durch beide Mechanismen zur Verfügung gestellt zu werden. Penicillamin, für das erstmalig die Metallothionein-induzierende Wirkung nachgewiesen werden konnte, ist der einzigen Nichtmetallinduktor von Metallothionein, der als Therapeutikum auch beim Menschen zum Einsatz kommt.
4. Die Metallothioneingehalte in menschlichen Leber- und Nierenrindenproben lagen mit Durchschnittswerten von 49,6 und 154 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht etwa fünf- und dreimal so hoch wie in der Leber und der Niere der Ratte. Mit steigenden Metallothioneingehalten in den menschlichen Nierenrinden wurde Cd zur hauptsächlichen Metallkomponente in dem Protein, wogegen sich die Thionein-gebundenen Zn- und Cu-Gehalte nicht veränderten. Dabei ergaben sich Thionein-gebundene Cd-Gehalte zwischen 1 und 66 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht und Gesamt-Cd-Gehalte zwischen 5 und 99 $\mu\text{g/g}$ Frischgewicht. Zwischen beiden Wertegruppen bestand eine gute Korrelation ($r = 0,932$). Der Zusammenhang zwischen dem Rauchen und der Zunahme des renalen Metallothionein- und Cd-Spiegels konnte nachgewiesen werden.

ABKÜPZUNGSVERZEICHNIS

AAS	Atom-Absorptions-Spektroskopie
Ag-Thionein	Ag-haltiges Metallothionein
BME	Basal Medium Eagle
Cd-Thionein	Cd-haltiges Metallothionein
Cu-Thionein	Cu-haltiges Metallothionein
h	Stunde
Hg-Thionein	Hg-haltiges Metallothionein
ICP-AES	Atom-Emissions-Spektroskopie mit induktiv gekoppelter Plasmaanregung
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
min	Minute
O.D.	optische Dichte
PBS	'Phosphate Buffered Saline'
S 9, S 18, S 100	Überstände nach 9 000 g, 18 000 g, 100 000 g
s.c.	subcutan
Thionein	metallfreie Form von Metallothionein
UPM	Umdrehungen pro Minute
w/v	Gewichtsteile pro Volumenteile
Zn-Thionein	Zn-haltiges Metallothionein

LEBENS LAUF

Am 29. April 1954 wurde ich als zweiter Sohn der Eheleute Erna und Ernst Heilmaier in München geboren.

1960 trat ich in die Volksschule an der Werdenfelsstraße in München ein und wechselte 1966 an die städtische Carl-von-Linde Realschule über. Dort legte ich 1970 die mittlere Reifeprüfung ab. Anschließend besuchte ich den mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig des Wittelsbacher Gymnasiums und erhielt 1973 das Zeugnis der Reife.

Zum Sommersemester 1974 begann ich mit dem Studium der Physik an der Ludwig-Maximilians-Universität München und wechselte zum Wintersemester 1974/75 auf das Studium der Chemie über. Im Mai 1977 legte ich die Diplom-Vorprüfung ab, und im November 1979 absolvierte ich den mündlichen Teil der Diplom-Hauptprüfung. Nach dem Anfertigen der Diplomarbeit unter Anleitung von Herrn Professor Dr. G. Szeimies am Institut für organische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München erlangte ich im September 1980 das Diplom in Chemie.

Nach Ableisten des Zivildienstes fertigte ich zwischen August 1982 und Oktober 1985 die vorliegende Dissertation an.

Über Ergebnisse dieser Arbeit wurde teilweise berichtet:

VERÖFFENTLICHUNGEN:

- Heilmaier, H.E., Schramel, P., and Summer, K.H. (1984) "Determination of Metallothionein as a Tool for 'Biological Speciation' of Zinc", in: "Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology, Vol. 3 (Brätter, P. and Schramel, P., eds.), Walter de Gruyter, Berlin, pp. 669-676.
- Heilmaier, H.E. and Summer, K.H. (1985) "Metallothionein Content and Zinc Status in Various Tissues of Rats Treated with Iodoacetic Acid and Zinc", *Arch. Toxicol.*, 56, 247-251.
- Summer, K.H., Drasch, G., and Heilmaier, H.E. "Metallothionein and Cd in Human Kidney Cortex: Influence of Smoking", *Human Toxicology*, (im Druck).
- Heilmaier, H.E., Jiang, J.L, Greim, H., Schramel, P., and Summer, K.H. "D-Penicillamine Induces Rat Hepatic Metallothionein" (Eingereicht zur Veröffentlichung).

VORTRÄGE/POSTER:

- Heilmaier, H.E. and Summer, K.H. (1983) "Hepatic Metallothionein Induction by Carbon Tetrachloride: Intracellular Redistribution of Zinc", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, Suppl. 322, R 118.
- Heilmaier, H.E. (1984) "Metallothionein - ein ubiquitäres metallbindendes Protein", Vortrag auf dem Symposium: "Schwermetalle. Biologische Wirkungen und Expositionsquellen", 1.3.1984, und GSF-Bericht A 6-84, pp. 88-94.
- Heilmaier, H.E. and Summer, K.H. (1984) "An Improved Method for the Determination of Metallothionein in Mammalian Tissues", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, Suppl. 325, R 24.
- Heilmaier, H.E. and Summer, K.H. (1984) "Metallothionein as Binding Site for Iodoacetic Acid", *Proceedings of 9th Drug Metabolism Workshop*, Nancy, France, June, 11-15, 1984, P 226.
- Summer, K.H., Drasch, G., and Heilmaier, H.E. (1985) "Cadmium and Metallothionein in Human Kidney Cortex: Influence of Smoking", *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, Suppl. 329, R 34.
- Heilmaier, H.E (1985) "Metallothionein und die Toxizität von Kadmium" Vortrag, GSF, 26.6.1985.

